Aus der Universitäts-Hals - Nasen - Ohren - Klinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Kley

UNTERSUCHUNGEN ZUR ULTRA - MIKROBESTIMMUNG DES KREATININS IN BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN.

ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR ULTRA - MIKROBESTIMMUNG DES KREATININS MIT DER JAFFÉ - REAKTION

Inaugural - Dissertation
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Dietrich Nitsche
aus Erfurt / Thüringen

Würzburg, den 30. Juni 1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543520_0006

Aus der Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Kley

UNTERSUCHUNGEN ZUR ULTRA-MIKROBESTIMMUNG DES KREATININS IN BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN. ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR ULTRA-MIKROBESTIMMUNG DES KREATININS MIT DER JAFFÉ-REAKTION

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Dietrich Nitsche
aus Erfurt/Thüringen

Würzburg, den 30. Juni 1980

Referent:	Prof. Dr. W. Kley
Korreferent:	Prof. Dr. D. Palm
Dekan:	Prof. Dr. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 29.7.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität Würzburg

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Problemstellung	2
1.2.	Chemie des Kreatinins	3
1.2.1.	Struktur	4
1.2.2.	Chemisches Verhalten	4
1.3.	Kreatininstoffwechsel	6
1.4.	Die diagnostische Bedeutung des Kreatinins	9
1.5.	Methoden zur quantitativen Kreatininbestimmung	10
1.5.1.	Farbreaktionen	11
1.5.2.	Nachweis der reduzierenden Wirkung	16
1.5.3.	Messung der UV-Absorption	16
1.5.4.	Gaschromatographie	17
1.5.5.	Enzymatische Bestimmung	18
2.	Die Mikro- und Ultra-Mikrobestimmung des Kreatinins in biologischen Flüssigkeiten	19
2.1.	Mikro- und Ultra-Mikromethoden zur Kreatininbestimmung	19
2.2.	Entwicklung einer neuen Ultra-Mikromethode	21
2.2.1.	Experimentelles	22
2.2.2.	Fluorimetrie	23
2.2.3.	Dünnschichtchromatographie	24
2.2.4.	Gaschromatographie	25
2.2.5.	Untersuchungen zur Kreatininbestimmung mit Polynitroaromaten	27
2.2.6.	Kreatininnachweis mit 3,5-Dinitrobenzonitril	28
2.3.	Kreatininbestimmung in der Perilymphe mit der Jaffé-Reaktion	30

Seite

3.	Die Reaktionspartner bei der Jaffé-Reaktion	32
3.1.	Verhalten von Kreatinin im sauren und alkalischen Milieu	32
3.1.1.	Methodik	32
3.1.2.	UV-Spektrum von Kreatinin	33
3.1.3.	Kreatinin im sauren Milieu	34
3.1.4.	Kreatinin im alkalischen Milieu	36
3.2.	Die Reaktion von Pikrinsäure mit NaOH	41
3.2.1.	Reaktionsmechanismen bei der Umsetzung von Nitroaromaten mit Basen	42
3.2.2.	Versuchsdurchführung	45
3.2.3.	Einfluß der OH^--Konzentration auf das Absorptionsspektrum	46
3.2.3.1.	Verlauf des Spektrums	46
3.2.3.2.	Extinktionsänderung bei konstanter Wellenlänge (485 nm; 388 nm)	49
3.2.3.3.	Quantitative Erfassung der absorbierenden Komponenten	51
3.2.4.	Die Anlagerung von OH^- an Pikrat	52
3.2.5.	Die Reaktionsprodukte	54
3.2.6.	Der Reaktionsablauf	56
3.2.7.	Mögliche Reaktionspartner des Kreatinins bei der Jaffé-Reaktion	61
4.	Reaktionsprodukt und Reaktionsmechanismus der Jaffé-Reaktion	62
4.1.	Das Reaktionsprodukt der Jaffe-Reaktion	62
4.1.1.	Versuchsdurchführung	63
4.1.1.1.	Darstellung des Jaffé-Adduktes	63
4.1.1.2.	Zusammensetzung des Jaffé-Adduktes	66
4.1.1.3.	Spektralphotometrie	67

Seite

4.1.2.	Chemische Charakterisierung des Jaffé-Adduktes	67
4.1.3.	Absorptionsspektrum von JA (MeOH) und JA(HCl)	69
4.1.3.1.	Verlauf in H_2O und DMSO	69
4.1.3.2.	Temperaturabhängigkeit	72
4.1.3.3.	pH-Abhängigkeit	72
4.1.4.	Struktur des Jaffé-Adduktes	76
4.1.4.1.	Ergebnisse der Kernresonanzspektroskopie	76
4.1.4.2.	Die Position der Kreatininanlagerung an Pikrat	77
4.1.4.3.	Die reaktive Gruppe des Kreatinins bei der Jaffé-Reaktion	78
4.1.4.4.	Vergleichende Betrachtung: JA(MeOH) - JA(HCl)	80
4.2.	Reaktionsmechanismus der Jaffé-Reaktion	81
4.2.1.	Bedeutung der NaOH für die Jaffé-Reaktion	81
4.2.2.	Reaktionsablauf	83
4.2.3.	Die Weiterreaktion des Jaffé-Adduktes	86
5.	Untersuchungen zur Optimierung der Reaktions- und Meßbedingungen der Jaffé-Reaktion	90
5.1.	Die Meßwellenlänge	92
5.2.	Die Problematik der Extinktionsmessung im Bereich einer "Flanke"	95
5.3.	Die Reaktionsbedingungen	97
5.3.1.	Die NaOH-Konzentration	97
5.3.1.1.	Versuchsdurchführung	99
5.3.1.2.	Einfluß der OH^--Konzentration auf das Jaffé-Addukt	99
5.3.1.2.1.	Verlauf des Absorptionsspektrums	99
5.3.1.2.2.	Extinktionskoeffizient	100
5.3.1.2.3	"Stabilität" des Jaffé-Adduktes	100
5.3.1.3.	Einfluß der OH^--Konzentration auf die Jaffé-Reaktion	101
5.3.1.3.1.	Reaktionsgeschwindigkeit	101
5.3.1.3.2.	Extinktionskoeffizient	104

Seite

5.3.1.3.3.	Konstanz des Extinktionsmaximums	106
5.3.1.4.	Der optimale NaOH-Konzentrationsbereich	107
5.3.2.	Die Pikratkonzentration	107
5.3.2.1.	Versuchsdurchführung	108
5.3.2.2.	Das Pikratspektrum zwischen 480 und 500 nm	109
5.3.2.3.	Einfluß der Pikratkonzentration auf die Jaffé-Reaktion	110
5.3.2.3.1.	Reaktionsgeschwindigkeit	110
5.3.2.3.2.	Extinktionskoeffizient	111
5.3.2.3.3.	Konstanz des Extinktionsmaximums	111
5.3.2.4.	Die Pikratkonzentration bei der Mikrobestimmung des Kreatinins	112
5.3.3.	Die Temperatur	112
5.3.3.1.	Versuchsdurchführung	114
5.3.3.2.	Temperatureinfluß auf das Pikrat-Spektrum	115
5.3.3.2.1.	Pikrat	115
5.3.3.2.2.	Hydroxy-Pikrat	117
5.3.3.3.	Temperatureinfluß auf das Jaffé-Addukt	117
5.3.3.3.1.	Absorptionsspektrum	117
5.3.3.3.2.	"Stabilität" des Jaffé-Adduktes	117
5.3.3.4.	Temperatureinfluß auf die Jaffé-Reaktion	119
5.3.3.4.1.	Extinktionskoeffizient	119
5.3.3.4.2.	Reaktionsgeschwindigkeit	119
5.3.3.4.3.	Konstanz des Extinktionsmaximums	121
5.3.3.5.	Die Reaktions- und Meßtemperatur bei der Mikrobestimmung	121
5.3.4.	Die Kreatininkonzentration	122
5.3.4.1.	Versuchsdurchführung	123
5.3.4.2.	Einfluß der Kreatininkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit	124
5.3.4.3.	Die Beziehung zwischen der Extinktion der Jaffé-Reaktion und der Kreatininkonzentration	126

		Seite
5.3.4.3.1.	Extinktionskoeffizient	126
5.3.4.3.2.	Das Lambert-Beer'sche Gesetz	127
6.	Die "Jaffé-Chromogene"	129
6.1.	Die Reaktion der wichtigsten "Jaffé-Chromogene" mit alkalischer Pikratlösung	129
6.1.1.	Jaffé-positive Verbindungen	129
6.1.2.	Versuchsdurchführung	133
6.1.3.	Einteilung der "Jaffé-Chromogene"	135
6.1.4.	Absorptionsspektren und mögliche Reaktionsformen	137
6.1.4.1.	Chromogen-Typ I	137
6.1.4.2.	Chromogen-Typ II	143
6.1.5.	Reaktionskinetik	145
6.1.5.1.	Rasch reagierende Chromogene	145
6.1.5.2.	Langsam reagierende Chromogene	146
6.2.	Die Jaffé-Reaktion mit Serum	151
6.2.1.	Extinktionsverlauf und Chromogenintereferenz bei der Serum-Kreatininbestimmung	151
6.2.2.	Verfahren zur Reduzierung der Chromogeninterferenz	155
7.	Die Enteiweißung	159
7.1.	Verfahren zur Abtrennung des Proteins	159
7.1.1.	Physikalische Methoden	159
7.1.2.	Chemische Fällungsmethoden	160
7.1.2.1.	Fällung der Proteine durch Dehydratation	161
7.1.2.2.	Fällung der Proteine als unlösliche Salze	161
7.1.2.2.1.	Kationische Fällungsmittel	161
7.1.2.2.2.	Anionische Fällungsmittel	162

		Seite
7.1.3.	Elimination des Proteinstöreffektes ohne Proteinfällung	168
7.2.	Die Proteinfällung bei der Kreatininbestimmung in kleinem Probevolumen	169
7.2.1.	Thermische Fällung	171
7.2.2.	Säurefällung	171
7.2.3.	Fällung durch Dehydratation	173
7.3.	Enteiweißung mit Hexafluorisopropanol (HFIP)	175
7.3.1.	Chemische Charakterisierung von HFIP	175
7.3.2.	Das Abtrennen eines leicht flüchtigen organischen Fällungsmittels aus dem Überstand	176
7.3.3.	Eiweißfällung mit HFIP bei der Kreatininbestimmung	178
7.3.3.1.	Das HFIP/Protein-Verhältnis	178
7.3.3.2.	Arbeitsvorschrift	179
7.3.3.3.	Wiederfindungsrate	180
7.3.3.4.	Präzision der Kreatininbestimmung bei Enteiweißung mit HFIP	182
7.3.3.5.	Methodenvergleich	182
7.3.3.5.1.	Enteiweißung mit HFIP und Trichloressigsäure	182
7.3.3.5.2.	Serum-Kreatininwerte nach HFIP-Fällung und nach anderen Fällungsverfahren	184
7.4.	Die Proteinfällung mit HFIP bei der Ultra-Mikrobestimmung des Kreatinins	186
8.	Diskussion	188
8.1.	Reaktionsbedingungen für die Jaffé-Reaktion	189
8.2.	Die Kreatininbestimmung in der Perilymphe	196
8.3.	Die Meßgenauigkeit	198
9.	Zusammenfassung	202
10.	Literaturverzeichnis	I-XXXII

1. EINLEITUNG

Aus elektrophysiologischen Untersuchungen ist bekannt, daß die Innenohrleistung weitgehend von der O_2- und CO_2-Konzentration, weniger von pH und Osmolarität abhängt (250). Aus der geringen Gefäßversorgung der Haarzellen kann man schließen, daß die Perilymphe als zusätzliches Vehikel für den Stofftransport dient.

Nach Untersuchungen von RAUCH (250) werden pro Minute 0,1 - 1 µl Perilymphe gebildet. Durch Messung der Patentblauabnahme im Innenohr wurde für die Perilymphe eine mittlere Halbwertszeit von 17 Minuten gefunden (264). Isotopenaustauschuntersuchungen führten zu Halbwertszeiten bis zu 100 Minuten (151).

Diese Austauschrate weist darauf hin, daß dem Stofftransport im Innenohr durch die Strömung der Perilymphe hinsichtlich der Innenohrfunktion eine besondere Bedeutung zukommt. Ihre quantitative Erfassung ist daher von großem Interesse. Gleichzeitig ist die Kenntnis der Größe des Perilymphaustausches für das Verständnis der Perilymphentstehung von grundlegender Wichtigkeit.

Die Messung des Stofftransportes, der allgemein eine Funktion der Strömung des Vehikels - in diesem Fall der Perilymphe -, der Diffusion, der Permeation, der Absorption sowie der aktiven Sekretion und Resorption ist, kann mit Farbstoffen, Isotopen, Ionen und körpereigenen Substanzen durchgeführt werden. Grundvoraussetzung für die hierbei verwendeten Substanzen ist jedoch, daß sie nicht absorbiert werden und physiologisch weitgehend inert sind, d.h. weder aktiv resorbiert noch sezerniert werden.

Zur Untersuchung des Stofftransportes im Innenohr eignen sich nur kleinmolekulare Verbindungen, die keine physiologische Bedeutung

haben und in keinem zusätzlichen Kompartiment gespeichert werden. Bei Untersuchungen mit K^{42} und Na^{24} wurde von RAUCH (250) eine aktive Ausscheidung und Rückresorption dieser Ionen im Innenohr beobachtet. Körperfremde Ionen werden in den meisten Fällen zusätzlich absorbiert, wodurch eine größere Halbwertszeit vorgetäuscht wird. Tritium scheidet für die Untersuchung des Stofftransportes ebenfalls aus, da es durch Einlagerung in die Hydroxylgruppen der Proteine und Mucopolysaccharide selektiv adsorbiert wird. Niedermolekulare organische Verbindungen erweisen sich für die Untersuchung des Stofftransportes durch Strömung dagegen als geeignet, wobei jedoch auszuschließen ist, daß sie, wie z.B. Glucose, metabolisiert werden. Von den wenigen Verbindungen, die für derartige Untersuchungen herangezogen werden können, kommen hauptsächlich Mannit, Harnstoff und Kreatinin in Frage.

Für unsere Untersuchungen wählten wir Kreatinin, da zu erwarten ist, daß es im Innenohr gleichmäßig verteilt vorliegt und weder aktiv rückresorbiert noch sezerniert wird. Die Bestimmung des Kreatinins in der Perilymphe ist auch insofern interessant, als sie Hinweise über den Energiestoffwechsel bzw. Energieumsatz des Innenohrs liefert, da nicht auszuschließen ist, daß Kretinphosphat auch im Innenohr als Energiereserve dient.

1.1. PROBLEMSTELLUNG

Die genaue Bestimmung der Kreatininkonzentration in der Perilymphe ist Voraussetzung für die Messung der Perilymphströmung durch Untersuchung der Halbwertszeit des Kreatinins, für die Prüfung eines Konzentrationsgleichgewichtes zwischen Blut- und Perilymphraum, d.h. zur weiteren Abklärung der Ultrafiltrationshypothese

der Perilymphgenese und für die Abklärung, ob Kreatinphosphat als Energielieferant bei der Schalltransformation in Frage kommt. Auch die Anwendung von radioaktiv markiertem Kreatinin kann hier die quantitative analytische Bestimmung nicht ersetzen.

Da intraoperativ jeweils nur Proben von 3 - 5 µl Perilymphe risikolos entnommen werden können, ist eine Ultra-Mikromethode für diese Bestimmung erforderlich. Die meisten der bisher bekannten Methoden sind jedoch nur mit einem Probevolumen von mindestens 20 µl durchführbar. Zur Erfassung der Kreatinin-Konzentration in kleineren Probevolumina wurden bis jetzt nur wenige Verfahren beschrieben, die alle noch mit einem sehr großen apparativen Aufwand durchführbar sind. Daher soll es Ziel dieser Arbeit sein, unter Berücksichtigung der bisher bekannten Methoden ein wenig aufwendiges Verfahren zu entwickeln, das eine hinreichend genaue Bestimmung der Kreatinin-Konzentration in einer Perilymphmenge von 3-5 µl ermöglicht.

1.2. CHEMIE DES KREATININS

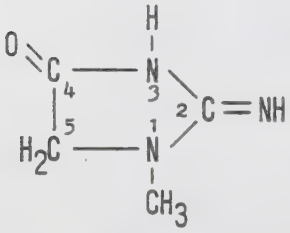
Kreatinin gehört zur Gruppe der Glycocyamidine, welche die cyclischen Anhydride der α-Guanidino-Carbonsäuren sind (160, 204).

Summenformel: $C_4H_7ON_3$; Molekulargewicht: 113,12

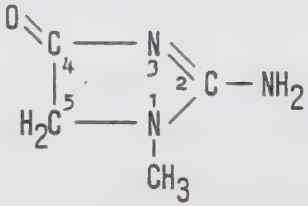
Aus Wasser kristallisiert Kreatinin in monoklinen, weißen Prismen aus, die sich bei 295°C zersetzen (16). Die Sättigungskonzentration bei 20°C beträgt in Wasser 8,7 g/100 ml und in Äthanol 0,133 g/100 ml.

1.2.1. Struktur

Die Glycocyamidine treten vielfach in mehreren tautomeren Formen auf. Allgemein wurde bisher angenommen, daß Kreatinin als 1-Methyl-2-Imino-Imidazolidin-4-on (= Kr I) vorliegt. NMR-Untersuchungen (160, 180, 204) zeigten jedoch, daß Kreatinin in wässriger, neutraler Lösung überwiegend als 1-Methyl-2-Amino-2-Imidazolin-4-on (= Kr II) vorliegt. Durch die endocyclische -C=N-Bindung, die eine Konjugation der Carbonylgruppe ermöglicht, wird eine größere Stabilität des Kreatinin-Moleküls erreicht (160, 180, 204).



Kr. I



Kr. II

1.2.2. Chemisches Verhalten

Kreatinin besitzt sowohl saure wie auch basische Eigenschaften. Bereits in schwach saurem Milieu lagert Kreatinin ein Proton an die Guanidinogruppe an, für dessen Abdissoziation bei 20°C ein pKa von 4,92 (20) bzw. 4,89 (118) gefunden wurde. In basischem Milieu kann ein schwach gebundenes Proton der Methylengruppe abgespalten werden. Ursache für die schwache Bindung ist der negativ-induktive Effekt der benachbarten Carbonyl-Gruppe (C-4). Für die Dissoziation des Methylen-Protons wurde

ein pKa von 12,7 (49) bzw. 13,4 (316) gefunden.

In wässriger Lösung kommt es zur Ausbildung eines gekoppelten Gleichgewichtes zwischen Kreatinin und Kreatinat, bzw. Kreatin, dessen Lage von pH und Temperatur abhängig ist.

$$\text{Kreatinin} + H_2O \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \text{Kreatinat} + H^+$$

Dieses Gleichgewicht liegt in wässriger, neutraler Lösung bei Raumtemperatur weitgehend auf seiten des Kreatinins. Mit Zunahme der Wasserstoffionen-Konzentration nimmt der Anteil des Kreatinins weiter zu; k_2 wird scheinbar größer. Ein Anstieg der OH^--Konzentration bedingt dagegen eine Verschiebung des Gleichgewichtes zum Kreatinat hin. Für k_1 und k_2 wurden in Abhängigkeit vom pH bei 30°C global folgende Werte bestimmt (nach CANNAN & SHORE 1928 (54)) :

pH	k_1	k_2
2.00	$1,17 \times 10^{-5}$	$72,8 \times 10^{-5}$
6.86	$44,2 \times 10^{-5}$	$27,2 \times 10^{-5}$
7.62	$28,6 \times 10^{-5}$	$17,5 \times 10^{-5}$
9.54	$25,7 \times 10^{-5}$	$15,8 \times 10^{-5}$

Kreatinin kann wie alle Glycocyamidine, die nicht in C-5 substituiert sind, oxydiert werden (192). Bei der Oxydation im alkalischen Milieu können hierbei Oxalsäure und N-Methylguanidin entstehen (303). Da die endocyclische -C=N-Bindung dem Molekül eine erhöhte Stabilität verleiht, wird Kreatinin durch Basen nur sehr langsam hydrolysiert, wobei je nach Reaktionsbedingungen Kreatin, 1-Methylhydantoin, 1-Methylhydantoinsäure oder Sarkosin und Harnstoff entstehen können (192).

Die Hydrolyse des Kreatinins verläuft mit einer Kinetik pseudo-erster Ordnung (204).

1.3. KREATININSTOFFWECHSEL

Kreatinin, 1844 erstmals von HEINTZ (133) und PETTENKOFER (241) im Harn nachgewiesen, stellt das Endprodukt des Kreatinstoffwechsels dar. Kreatin wurde 1835 von CHEVREUL (64) als Bestandteil von Fleischextrakten beschrieben und von LIEBIG 1847 (193) aus Muskel isoliert und genauer untersucht.

Ca. 98 % des Gesamtkreatins sind in der Muskulatur lokalisiert. Der mittlere Kreatingehalt der quergestreiften Muskulatur des Menschen beträgt ca. 30 mmol/kg (43, 95, 117), wobei 50 - 60 % (43, 95) als Kreatin-Phosphat vorliegen, das als Energiereserve eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Organe spielt.

Die Vorstufen des Kreatins sind, wie von BLOCH & SCHOENHEIMER (35) und von BORSOOK & DUBNOFF (42) gezeigt, Glycin und Arginin, wobei die erste Stufe der Kreatin-Synthese die Übertragung der Amidin-Gruppe ($-C\lessgtr^{NH}_{NH_2}$) des Arginins durch eine Transamidase

(Glycin amidinotransferase EC 2.1.4.1) auf das Glycin unter Bildung von Guanidinoacetat (Glycocyamidin) ist (42). In einem zweiten Reaktionsschritt entsteht durch Methylierung des Guanidinocetats Kreatin, wobei S-Adenosylmethionin der Methyl-Donator ist und die Methylgruppe durch eine Methyltransferase (Guanidinoacetat methyltransferase EC 2.1.1.2) übertragen wird (44, 55, 73). Anfangs wurden in der Niere neben Guanidinoacetat nur die Glycinamidinotransferase und in der Leber nur die Methyltransferase gefunden, im Pankreas dagegen (310) beide Enzyme, so daß für die Biosynthese des Kreatins allgemein zwei Bildungswege angenommen wurden:
ein renaler Weg, bei dem die Bildung des Guanidinoacetats in der Niere erfolgt mit anschließender Methylierung in der Leber (44, 55, 73, 102) und ein extrarenaler Weg, bei dem beide Schritte der Kreatin-Synthese im Pankreas ablaufen, wo 40-60% des Kreatins gebildet werden (105, 106, 149). Da jedoch bei neueren Untersuchungen (306) beide für die Kreatin-Synthese erforderlichen Enzyme beim Menschen sowohl in der Leber als auch in der Niere, in der Milz und im Gehirn nachgewiesen werden konnten, ist anzunehmen, daß beide Stufen der Kreatin-Biosynthese außer im Pankreas auch in Niere, Leber und anderen Organen ablaufen. Der Kreatin-Transport erfolgt im Organismus durch das Serum (95).

Unter Spaltung von ATP kann Kreatin mit Hilfe der Kreatinkinase (ATP-Kreatin-Transphosphorylase EC 2.7.3.2) zu Kreatinphosphat phosphoryliert werden. Als Phosphatgruppen-Donator stellt Kreatinphosphat für den Organismus eine Energiereserve dar. Seine Hauptbedeutung besteht darin, die rasche Deckung eines erhöhten ATP-Bedarfs zu ermöglichen, wobei der Phosphatrest enzymatisch (Kreatinkinase EC 2.7.3.2) auf ADP übertragen wird. Es kommt beim Menschen in der glatten und quergestreiften Muskulatur sowie im Herzmuskel und in den Nervenzellen vor. Bei Abspaltung des Phos-

phatrestes kann Kreatinphosphat sowohl in Kreatin als auch direkt in Kreatinin übergehen (43).

Die Lactamisierung des Kreatins zu Kreatinin läuft bei 37°C und dem im Organismus herrschenden pH sehr langsam ab (43, 117, 119), so daß es wenig wahrscheinlich ist, daß die täglich ausgeschiedene Kreatininmenge - bei Frauen durchschnittlich 20 mg/kg/24 Std., bei Männern 25 mg/kg/24 Std. (98, 271) - nur direkt aus dem Gewebskreatin gebildet wird. Da jedoch bei der Hydrolyse des Kreatinphosphates ca. 3-4mal rascher Kreatinin gebildet wird als bei der direkten Lactamisierung des Kreatins (43, 192), wird angenommen (43, 136), daß der größte Teil des ausgeschiedenen endogenen Kreatinins bei der Hydrolyse von Kreatinphosphat entsteht, was auch aus energetischen Gesichtspunkten verständlich ist, und nur ein geringer Teil direkt aus Kreatin hervorgeht. Bisher konnte kein Enzym nachgewiesen werden, welches die Lactamisierung des Kreatins zu Kreatinin katalysiert, weshalb diese als eine nichtenzymatische Reaktion angesehen wird (43, 149, 203, 305).

Die tägliche Kreatin-Kreatinin-Umsatzrate beträgt etwa 2 % (136). Einzige Stoffwechselquelle des endogenen Kreatinins ist Kreatin. Ein geringer Anteil des Serumkreatinins kann auch aus der Zufuhr von präformiertem Kreatinin mit der Nahrung stammen, wobei die übliche Fleischzufuhr jedoch nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Serumkreatinin-Konzentration führt (121, 236).

Bei normaler Nierenfunktion wird Kreatinin nicht im Körper abgebaut. Es wird dann nur über die Niere ausgeschieden. In diesem Fall beträgt die mittlere Halbwertszeit des Kreatinins im Organismus 3,85 Stunden (65). Bei eingeschränkter Nierenfunktion wurde

jedoch in Abhängigkeit von dem Grad der Funktionsstörung auch ein mehr oder minder starker Abbau (16-65 %) des Kreatinins im Körper nachgewiesen, wobei CO_2 und Methylamin sowie eine bisher noch nicht identifizierte Verbindung entstehen (149). Möglicherweise kommt es hier zu einer Kreatininausscheidung in den Darm, wo dann der Abbau durch Bakterien erfolgt.

1.4. DIE DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG DES KREATININS

a) Die Hauptbedeutung der Kreatinin-Bestimmung liegt in der nephrologischen Funktionsdiagnostik. Der Serumkreatinin-Spiegel und die Menge der täglichen Kreatininausscheidung durch die Niere sind streng mit der Muskelmasse korreliert (121). Bei normaler Nierenfunktion, bei gleichbleibender körperlicher Belastung sowie bei annähernd gleichbleibender Zufuhr von Kreatinin und Kreatin mit der Nahrung sind sie relativ konstant und stellen eine individuelle Größe dar.

Kreatinin verteilt sich gleichmäßig im Gesamtkörperwasser (65) und wird bei normaler Serumkonzentration und normaler Nierenfunktion weder rückresorbiert noch sezerniert. Bei endogen oder exogen erhöhtem Serumkreatinin-Spiegel kann zusätzlich eine tubuläre Sekretion erfolgen (121). Eine Abnahme der glomerulären Filtration führt zu einer Zunahme der Halbwertszeit des Kreatinins im Organismus - die Größe der Halbwertszeit ist von dem Grad der Nierenfunktion abhängig und steigt z.B. bei Einschränkung der Nierenfunktion um 50 % von 3,85 Stunden auf 7,7 Stunden an (65) - und bedingt dadurch eine Zunahme der Serumkreatinin-Konzentration.

b) Bei der Diagnostik der Myopathien kann die Bestimmung der Kreatininausscheidung bei gleichzeitiger Bestimmung des Kreatins

in Serum und Harn als ergänzende Untersuchung verwendet werden.

c) Da Kreatinphosphat bei Abspaltung des Phosphatrestes sowohl in Kreatin als auch in Kreatinin übergeht (s. Kap. 1.3.), kann die Bestimmung der Kreatinin-Konzentration im Gewebe neben der Bestimmung des Kreatinphosphates sowie des Kreatins und des anorganischen Phosphates als ergänzende Untersuchung zur Beurteilung des Kreatinphosphat/Kreatin-Systems herangezogen werden. Die Kreatininbestimmung in der Perilymphe ermöglicht damit zusätzliche Rückschlüsse über Ablauf und Regulation des Energiestoffwechsels der Haarzellen bei Ischämie oder nach sehr starker Beschallung.

d) Auf die Bedeutung des Kreatinins als Indikator für den Stofftransport im Innenohr wurde bereits in der Einleitung hingewiesen.

1.5. METHODEN ZUR QUANTITATIVEN KREATININ-BESTIMMUNG

Das anfangs zur quantitativen Kreatinin-Bestimmung benutzte gravimetrische Verfahren von NEUBAUER (226, 227), welches auf der Schwerlöslichkeit des Kreatinin-Zink-Doppelsalzes in Alkohol beruht, war sehr umständlich und ergab weitgehend ungenaue Werte (96). Nachdem JAFFÉ (1886) die Bildung eines farbigen Molekülkomplexes bei der Reaktion von Kreatinin mit Pikrat in alkalischem Milieu beschrieben hatte (148), wurde diese Reaktion von FOLIN (1904) zur quantitativen Kreatininbestimmung im Urin (96) und später (1914) zur Kreatininbestimmung in Serum und Gewebe eingeführt (97).

Der Nachteil dieser Reaktion liegt jedoch in ihrer geringen Spezifität. Bereits JAFFÉ beschrieb, daß auch Aceton und Glucose mit alkalischer Pikratlösung unter Bildung eines farbigen Molekülkomplexes reagieren (148). In der Folgezeit wurde eine große Zahl von Substanzen im Serum gefunden, die ebenfalls mit alkalischer Pikratlösung reagieren und die Kreatininbestimmung beeinflussen (s. Kap. 6.1.1.). Dies führte zur Entwicklung einer Vielzahl von Methoden, die alle das Ziel hatten, die Spezifität der Kreatininbestimmung

durch Elimination der Störfaktoren zu verbessern. Der größte Teil dieser Verfahren basiert auf der Jaffé-Reaktion, wobei versucht wird, die Spezifität und Reproduzierbarkeit der Bestimmung durch Veränderung der Reaktionsbedingungen und/oder Abtrennung der Chromogene zu erhöhen (s. Tab. XII). Die anderen Methoden, die neben der Jaffé-Reaktion zur quantitativen Kreatininbestimmung entwickelt wurden (s. Tab. I), beruhen überwiegend auf einer der folgenden Eigenschaften des Kreatinins:

1. der Neigung des Kreatinins, mit Polynitroaromaten im alkalischen Milieu einen farbigen Molekülkomplex zu bilden;
2. der reduzierenden Wirkung des Kreatinins;
3. der Eigenabsorption des Kreatinins im UV-Bereich

Daneben wurden Verfahren entwickelt, bei denen der Abbau des Kreatinins enzymatisch katalysiert wird. Die hierbei entstehenden Spaltprodukte werden zur Kreatininbestimmung quantitativ erfaßt.

1.5.1. Farbreaktionen

Die Methoden zum quantitativen Kreatinin-Nachweis, bei denen Pikrat durch andere Nitroaromate ersetzt wird, beruhen auf einem ähnlichen Reaktionsmechanismus wie die Jaffé-Reaktion, nämlich der Reaktion von Polynitroaromaten mit CH-aciden Verbindungen in alkalischem Milieu unter Bildung eines anionischen σ-Komplexes (s. Kap. 4.2.2.). Daher führen auch hier CH-acide Komponenten des Serums (s. Kap. 6.1.4.1.) zu einer Verfälschung der Meßwerte. Jedoch ist bei fast allen diesen Verfahren der Chromogenanteil an der Gesamtabsorption geringer als bei der Jaffé-Reaktion (17, 37, 186, 234, 235, 256, 272). Die Interferenz durch reduzierende Verbindungen wie z.B. Glucose oder Fructose nimmt dage-

gen bei Ersatz des Pikrates durch andere Nitroaromate nur geringgradig ab (235, 256, 272).

Außer der etwas größeren Spezifität ist es von Vorteil, daß das Spektrum der in Tab. I als Farbreagenzien aufgeführten Nitroaromate im Bereich des langwelligen Absoprtionsmaximums (500-560 nm) ihrer jeweiligen Reaktionsprodukte mit Kreatinin nur eine geringe Absorption aufweist.

Der Vorteil, den die größere Spezifität bietet, wird aber bei Verwendung einer alkalischen Lösung von 3,5-Dinitrobenzoat als Farbreagenz durch die ausgeprägte Instabilität des Reaktionsproduktes und der dadurch bedingten geringeren Reproduzierbarkeit sowie durch den niedrigen Extinktionskoeffizienten des Reaktionsproduktes (37, 58, 234, 256) weitgehend aufgehoben. Dieser Nachteil konnte durch eine Änderung der Reaktionsbedingungen nur z.T. ausgeglichen werden (58, 235, 256). Die Empfindlichkeit ist bei Kreatininbestimmung mit 3,5-Dinitrobenzoat - je nach Wahl der Reaktionsbedingungen - ca. 45 - 65% geringer als bei Bestimmung durch die Jaffé –Reaktion (58, 234, 272).

Bei Verwendung von 3,5-Dinitrobenzolsulfonat (5, 222) bzw. 2,2', 4,4'-Tetranitrobiphenyl (224), von 3,5-Dinitrobenzoylchlorid (234) oder Methyl-3,5-Dinitrobenzoat (235, 272) zeigt das Reaktionsprodukt der Nitroverbindung mit Kreatinin hinsichtlich der Stabilität ein ähnliches Verhalten wie das Reaktionsprodukt der Jaffé-Reaktion. Durch Lösen der Reaktionspartner in DMSO und Methanol wird bei den Bestimmungsmethoden, bei denen 3,5-Dinitrobenzoylchlorid bzw. Methyl-3,5-Dinitrobenzoat als Farbreagenz verwendet wird, die Stabilität des Reaktionsproduktes im Meßansatz verbessert und dadurch eine Erhöhung des Extinktionskoeffizienten erzielt. 3,5-Dinitrobenzoylchlorid hat jedoch den Nachteil, daß die Instabi-

BESTIMMUNGSMETHODE	AUTOREN
A) FARBREAKTIONEN DES KREATININS	
I. Kreatininbestimmung in der Probe	
1) Reaktion mit Dinitroaromaten in alkalischem Milieu	
a) 3,5-Dinitrobenzoesäure Base: NaOH Lösungsmittel: H_2O	Benedict & Behre (1936) Langley & Evans (1936), Bollinger (1936); Bollinger (1938); Röttger (1948), Carr (1953), Parekh & Sima (1977)
b) 3,5-Dinitrobenzoylsulfoessäure Base: NaOH Lösungsmittel: H_2O	Akatsuka et al. (1958), Murata et al. (1964)
c) 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol Base: NaOH Lösungsmittel: H_2O	Ishidate & Sazaguchi (1950)
d) 3,5-Dinitrobenzoylchlorid Base: Tetramethylammoniumhydroxid ($C_4H_{13}NO$) Lösungsmittel: H_2O/Methanol/DMSO (1 : 0,6 : 0,33)	Parekh et al. (1976)
e) Methyl-3,5-Dinitrobenzoat Base: Tetramethylammonium-hydroxid ($C_4H_{13}NO$) Lösungsmittel: H_2O/DMSO/Methanol (1 : 0,95 : 0,05)	Sima & Parekh (1977); Parek & Sima (1977)
f) 2,2', 4,4'-Tetranitrobiphenyl Base: KOH Lösungsmittel: Methyl-Cellosolve/Aethanol/H_2O (4,5 : 3,85 : 1)	Nakadate et al. (1964)
2) Reaktion mit 1,4-Naphthochinon-2-Kaliumsulfonat und aethanol. α-Naphthollösung in alkal. Milieu. Extraktion des Farbkomplexes mit Methylenchlorid	Sullivan & Irreverre (1939); Ishidate & Sakaguchi (1950); Sullivan & Irreverre (1958)
II. Chromatographische Abtrennung des Kreatinins und anschliessender Nachweis auf dem Träger bzw. im Eluat mittels Farbreaktion	
1) Papierchromatographie und Nachweis mit:	
a) Natrium-Nitroprussid/NaOH/H_2O_2	Hofmann & Wünsch (1958)
b) p-Dimethylaminobenzaldehyd/Essigsäureanhydrid	Reis (1960)
c) tert.-Butylhypochlorit/KJ/Stärke	Masur et al. (1962)
2) Dünnschichtchromatographie und Nachweis mit Ninhydrin, NaOH (Fluorimetrie)	Beyermann & Wisser (1969)

BESTIMMUNGSMETHODE	AUTOREN
B) REDUKTIONSPROBEN (Nachweis des Kreatinins aufgrund seiner reduzierenden Wirkung)	
I. Kreatininbestimmung in der Probe	
1) quantitative Erfassung des Reduktionsproduktes bei Reduktion von:	
a) Kaliumhexacyanoferrat (III): Bestimmung von Kaliumhexacyanoferrat (II) mit Ammoniumeisen (III)-sulfat	Kayser & Molster (1956); Varma et al. (1968)
b) Quecksilber(II)-jodid ("Nesslers Reagenz"): Nephelometrische Bestimmung d. gebildeten metallischen Hg	Barclay & Kenney (1947)
c) Kaliumquecksilber(II)-rhodanid: Bestimmung der Änderung der Hg-Ionenkonzentration mit 1,5-Diphenylthiocarbazon	Steigens et al. (1950); Steigens (1953); Steigens (1953)
2) Bestimmung des bei Oxydation des Kreatinins in alkal. Milieu entstehenden Methylguanidin mit α-Naphthol u. Natriumhypochlorit (= Sakaguchi-Reaktion)	
a) Quecksilber(II)-oxid	Rieger (1938)
b) Nesslers Reagenz ($K_2(HgJ_4)$+KOH)	Chazerun (1958)
c) o-Nitrobenzaldehyd	Van Pilsum et al. (1956); Martinez et al. (1960); Cooper & Biggs (1961)
3) Bestimmung des Kreatinins durch potentiometrische Titration mit Kaliumquecksilber(II)-jodid ($K_2(HgJ_4)$)	Skramovsky (1953); Lampert (1959)
II. Dünnschichtchromatographische Abtrennung des Kreatinins und anschliessender Nachweis auf dem Träger mit:	
a) Triphenyltetrazoliumchlorid/NaOH	Lorentz & Hoffmeister (1968)
b) Kaliumwismutjodidlösung/Aethylacetat/H_2SO_4	Tyihák & Vágujfalvi (1970)

Fortsetzung Seite 14

BESTIMMUNGSMETHODE		AUTOREN
C)	**BESTIMMUNG DER UV-ABSORPTION**	
	Chromatographische Abtrennung des Kreatinins u. anschliessende Bestimmung seiner Absorption im UV-Bereich	
1)	Papierchromatographie	Pfeil (1956)
2)	Säulenchromatographie	
a)	Kationenaustauscher (Adsorption aus saurer Lösung)	Carisano et al. (1969)
b)	Anionenaustauscher (Adsorption aus alkal. Lösung)	Adams et al. (1962); McEvoy-Bowe (1966); Scott et al. (1967)
3)	Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Phasenumkehr	Lim et al. (1978); Chiou et al. (1978); Soldin & Hill (1978);
4)	Gelfiltration	Sinha et al. (1968)
D)	**GASCHROMATOGRAPHIE**	
	Gaschromatograph. Isolation d. Kreatinins und Bestimmung durch:	
1)	Flammenionisationsdetektor Darstellung des flüchtigen Kreatininderivates mit:	
a)	Trifluoressigsäureanhydrid	Cancalon et al. (1972); Lim et al. (1978)
b)	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid	Cancalon et al. (1972)
c)	N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid	Lawson (1975)
2)	Massenspektrometer Darstellung des flüchtigen Kreatininderivates mit:	
a)	Trifluoressigsäureanhydrid	Lim et al. (1978)
b)	Trifluoressigsäureanhydrid (1,2-Epoxypropan)	Björkhem et al. (1977)
c)	N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid	Lawson (1975)

BESTIMMUNGSMETHODE		AUTOREN
E)	**ENZYMATISCHE BESTIMMUNG**	
1)	Creatinin-Amido-Hydrolase (EC 3.5.2.-) Kopplung der enzymat. katalysierten hydrolytischen Spaltung von Kreatinin zu Kreatin mit einer NADH-verbrauchenden Reaktion	Wahlefeld et al. (1972); Munz et al. (1974); Moss et al. (1975); Borner et al. (1976); Lanser et al. (1979)
2)	Creatinase (EC 3.5.4.2.) Enzymat. Spaltung des Kreatinins in N-Methylhydantoin und Ammoniak	
a)	Bestimmung des freigesetzten Ammoniaks mit einer Membranelektrode	Thompson & Rechnitz (1974); Meyerhoff & Rechnitz (1976)
b)	indirekter fluorimetrischer Ammoniaknachweis (NADH-Fluoreszenz) durch eine gekoppelte NADH-verbrauchende Reaktion	Chen et al. (1980)
F)	**INVERSE POLAROGRAPHISCHE BESTIMMUNG**	
	Umsetzung des Kreatinins mit alkal. Lösung von 3,5-Dinitrosalicylsäure	Blass & Thibert (1974)

Tab. I: Übersicht über die Methoden zur quantitativen Kreatininbestimmung in biologischen Flüssigkeiten, die neben der Jaffé-Reaktion entwickelt wurden

lität dieser Nitroverbindung zu einer Veränderung der Leerwertabsorption und damit zu einer Einschränkung der Reproduzierbarkeit der Kreatininbestimmung führt (235, 272).
Folgende Extinktionskoeffizienten wurden bei der Kreatininbestimmung mit den in Tab. I aufgeführten Dinitroaromaten gefunden:
Methyl-3,5-Dinitrobenzoat: $7,91 \times 10^5$ cm^2/mol (272);
3,5-Dinitrobenzoylchlorid: $8,01 \times 10^5$ cm^2/mol (234);
3,5-Dinitrobenzolsulfonat: $1,50 \times 10^6$ cm^2/mol (222);
2,2',4,4'-Tetranitrobiphenyl: $8,01 \times 10^6$ cm^2/mol (224).
Nur bei der letztgenannten Verbindung ist der Extinktionskoeffizient mit dem bei der Jaffé -Reaktion gefundenen Wert von $5,6 \times 10^6$ cm^2/mol (202) bis $9,1 \times 10^6$ cm^2/mol (219) vergleichbar. Die Erhöhung der Spezifität wird also hauptsächlich auf Kosten der Empfindlichkeit erzielt.

Das von SULLIVAN & IRREVERRE (290) angegebene Verfahren, das auf der Bildung eines farbigen Molekülkomplexes bei der Reaktion von Kreatinin mit 1,4-Naphthochinon-2-Kaliumsulfonat und äthanolischer α-Naphthollösung im alkalischen Milieu beruht, ist zwar sehr spezifisch (290), jedoch ergaben vergleichende Untersuchungen (76, 89) eine extrem starke Streuung der Meßwerte bei dieser Methode. Bei Bestimmung mit 1,4-Naphthochinon-2-Kaliumsulfonat wurden jeweils wesentlich höhere Kreatininwerte gefunden, als bei der zum Vergleich durchgeführten Bestimmung mit der Jaffé -Reaktion (76, 89).

Die meisten Verfahren, mit denen Kreatinin nach vorheriger papier- oder dünnschichtchromatographischer Abtrennung von den anderen Substanzen auf dem Träger nachgewiesen wird, sind zum quantitativen Kreatinin-Nachweis wenig geeignet, da die hierbei gebildeten Farbkomplexe häufig sehr instabil sind oder die Nachweisreaktion nur eine sehr geringe Empfindlichkeit besitzt.

1.5.2. Nachweis der reduzierenden Wirkung

Bei dem quantitativen Nachweis des Kreatinins aufgrund seiner reduzierenden Wirkung auf Kaliumhexacyanoferrat (III) oder Quecksilber(II)-Verbindungen (284) werden die anderen reduzierenden Substanzen des Serums ebenfalls mit bestimmt.

Bei der Kreatininbestimmung durch die Sakaguchi-Reaktion wird das bei der Oxydation des Kreatinins entstehende Methylguanidin quantitativ erfaßt. Die hierbei erforderlichen zahlreichen Pipettierschritte schränken die Reproduzierbarkeit der Meßwerte im Vergleich zur Jaffé-Reaktion sehr stark ein. Eine Überprüfung des von VAN PILSUM (303) angegebenen Verfahrens, bei dem die Oxydation des Kreatinins mit o-Nitrobenzaldehyd durchgeführt wird, ergab einen Variationskoeffizienten von 50 (127). Ein weiterer Nachteil liegt darin, daß die Oxydation des Kreatinins durch o-Nitrobenzaldehyd im alkalischen Milieu nicht immer quantitativ vollständig abläuft (225), so daß mit dieser Methode zu niedrige Kreatininwerte gefunden werden (61, 89, 225). Da auch Kreatin durch o-Nitrobenzaldehyd zu Oxalsäure und Methylguanidin oxydiert wird (251) und andere Verbindungen im Serum mit α-Naphthol ebenfalls eine Farbreaktion ergeben, besitzt die Kreatininbestimmung mit der Sakaguchi-Reaktion eine geringere Spezifität, als die Bestimmung mit der Jaffé-Reaktion (225).

1.5.3. Messung der UV-Absorption

Eine weitgehend störungsfreie Bestimmung der Kreatininkonzentration wird durch die Messung der Eigenabsorption des Kreatinins im UV-Bereich (s. Abb. 1) ermöglicht (4, 57, 66, 68, 147, 194, 208, 265, 273, 278, 279). Hierzu wird Kreatinin durch Hochdruck-

Flüssigkeits-Chromatographie, Ionenaustausch- oder Gelchromatographie von den anderen im UV-Bereich absorbierenden Verbindungen abgetrennt. Die Messung der Absorption wird von den meisten Autoren bei 234 oder 235 nm durchgeführt. - Bei 234 nm beträgt der Extinktionskoeffizient des Kreatinins $6,6 \times 10^6$ cm^2/mol (s. Kap. 3.1.2.).-Lediglich LIM (194) wählte für die Kreatininbestimmung den längerwelligen Bereich (255 nm), während die Absorptionsmessungen von CHIOU et al. (66, 68) bei 215 nm und von SOLDIN et al. (278, 279) im Bereich der kürzerwelligen Bande des Kreatinins bei 200 nm durchgeführt wurden. Dieses Verfahren besitzt neben einer hohen Spezifität eine gute Reproduzierbarkeit. Isotopenuntersuchungen haben gezeigt, daß der Verlust des Kreatinins bei Abtrennung durch Ionenaustauschchromatographie sehr gering ist (24).

1.5.4. Gaschromatographie

Die Massenspektrometrie (30, 191, 194) ermöglicht ebenso wie die Konzentrationsbestimmung mit dem Flammenionisationsdetektor (53, 191, 194) nach gaschromatographischer Vortrennung einen sehr spezifischen, quantitativen Kreatinin-Nachweis, hat jedoch aufgrund ihres großen apparativen Aufwandes lediglich als Referenzmethode bei der Beurteilung der verschiedenen Kreatinin-Bestimmungsverfahren Bedeutung. Außerdem ist die Darstellung des flüchtigen Kreatinin-Derivates noch mit gewissen Schwierigkeiten verbunden (s. Kap. 2.2.4.), die auch durch Verwendung von Trifluoressigsäureanhydrid nur zum Teil gelöst werden konnten (194).

1.5.5. Enzymatische Bestimmung

Hinsichtlich Spezifität stellen die enzymatischen Bestimmungsmethoden eine echte Alternative zur Jaffé-Reaktion dar. Es wurden bisher zwei verschiedene Enzyme isoliert, die den Abbau des Kreatinins katalysieren. Creatininase (EC 3.5.4.2.1) (209, 210) katalysiert die Spaltung von Kreatinin zu N-Methylhydantoin und Ammoniak. Die Menge des freigesetzten Ammoniaks wird bei der von THOMPSON et al. (1974) angegebenen Methode mit einer Membranelektrode bestimmt und als Maß für die Kreatininkonzentration verwendet (212, 298).

Bei dem von WAHLEFELD et al. (309) beschriebenen Verfahren wird die durch Creatinin-Amido-Hydrolase (EC 3.5.2.-) katalysierte Hydrolyse des Kreatinins zu Kreatin mit einer dreistufigen, NADH-verbrauchenden Reaktion gekoppelt, bei der Kreatin zu Kreatin-Phosphat phosphoryliert wird. Die Kreatininkonzentration der Probe ist hierbei der durch die NADH-Oxydation bedingten Extinktionsabnahme proportional (187, 220). Bei diesem Verfahren interferiert nur Pyruvat durch den Verbrauch von NADH und bei höherer Konzentration auch Lactat durch kompetitive Hemmung der Indikator-Reaktion (36).

Die in Tab. I zusammengefaßten Methoden zur quantitativen Kreatinin-Bestimmung sind zwar, wie oben ausgeführt, zum Teil spezifischer als die Jaffé-Reaktion, stellen jedoch hinsichtlich Empfindlichkeit und Praktikabilität mit Ausnahme der enzymatischen Bestimmungsmethoden, die in der klinischen Routine-Diagnostik bisher aber wenig Verwendung finden, keine gute Alternative zur Jaffé-Reaktion dar. Die meisten dieser Verfahren wurden wegen ihrer zum Teil umständlichen Handhabung bisher kaum angewendet, so daß die Jaffé-Reaktion in ihren verschiedenen Modifikationen noch immer die im klinisch-chemischen Labor am häufigsten verwendete Methode zur Kreatinin-Bestimmung ist.

2. DIE MIKRO- UND ULTRA-MIKROBESTIMMUNG DES KREATININS IN BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN

2.1. MIKRO- UND ULTRA-MIKROMETHODEN ZUR KREATININBESTIMMUNG

Der größte Teil der bisher zur Mikrobestimmung des Kreatinins entwickelten Verfahren beruht auf der Jaffé-Reaktion. Mit dem Endpunktverfahren wurden Mikromethoden für ein Mindestvolumen von 50 µl (233) bis 100 µl Serum (28, 164, 219, 286) entwickelt. Durch Anwendung des kinetischen Verfahrens konnte das Mindestvolumen von 50 µl (85, 93, 165) auf 25 µl (130), bzw. 20 µl Serum (277) gesenkt werden. Zur Routinebestimmung wurde für ein Probevolumen von 25 µl Serum bereits ein automatisiertes Verfahren mit einem Probendurchsatz von 55/h entwickelt, das auf der kinetischen Methode basiert (77, 150). Bei der von McLEAN et al. (209, 210) angegebenen Methode, bei welcher der Chromogenanteil der Probe durch Kopplung der Jaffé-Reaktion mit der Creatininase-Reaktion erfaßt wird, ist ein Mindestvolumen von 2 x 25 µl Serum erforderlich.

Die dünnschichtchromatographischen Verfahren erbrachten bisher keine Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit. Bei Nachweis des Kreatinins auf dem Träger bzw. im Eluat konnte lediglich eine untere Nachweisgrenze von 0,4 µg Kreatinin/Probe (= ca. 75 µl Normalserum) (237) erreicht werden.

Eine deutliche Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit bei der enzymatischen Bestimmung gelingt durch Fluoreszenzmessung (63). Hierzu wird das bei Spaltung des Kreatinins durch Creatininase freigesetzte Ammonium durch eine NADH-verbrauchende enzymatische Reaktion

auf ∝-Ketoglutarsäure übertragen. Die Geschwindigkeit, mit der sich die NADH-Fluoreszenz bei 460 nm ändert, ist ein Maß für die Kreatininkonzentration. Mit diesem Verfahren ist der Kreatinin-Nachweis in 15 µl Serum möglich.

Das einzige, bisher bekannte Ultra-Mikroverfahren, das auf der photometrischen Erfassung der Jaffé-Reaktion beruht, wurde von BROWN et al. 1977 (47) beschrieben. Durch Messung der Absorption der Jaffé-Reaktion in einem speziell entwickelten Durchfluß-Mikroanalysator bei 510 nm können Kreatinin-Mengen bis zu 5 ng/Probe erfaßt werden, was einem Probevolumen von 1 - 2 µl Normalserum entspricht. Kreatinin wird hierbei durch vorgeschaltete Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie von den anderen Verbindungen des Serums abgetrennt.

Bei der direkten Bestimmung des Kreatinins aufgrund seiner UV-Absorption wurde bei 255 nm eine untere Nachweisgrenze für ein Probevolumen von 100 µl Normalserum gefunden (194). Durch Messung bei 215 nm (66, 68), bzw. bei 200 nm (278, 279) konnte die Nachweisgrenze auf 10 µl Normalserum gesenkt werden. Auch bei diesem Verfahren wird Kreatinin durch Vorschalten der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie von den anderen Verbindungen der Probe abgetrennt.

Durch die inverse polarographische Bestimmung des Kreatinins mit alkalischer Pikratlösung oder 3,5-Dinitrosalicylsäure (31), bei der die Änderung des Diffusionsstromes der ersten Nitroreduktionswelle ein Maß für die Kreatinin-Konzentration darstellt, wird ebenfalls eine sehr hohe Nachweisempfindlichkeit erreicht. Da jedoch hier eine Störung der Messung durch Mitreaktion der anderen Verbindungen des Serums zu erwarten ist, muß der inversen polarographi-

schen Bestimmung eine Isolation des Kreatinins vorausgehen, wodurch der Anwendungsbereich dieser Methode stark eingeschränkt wird.

Der bisher empfindlichste quantitative Nachweis wird durch die Bestimmung mittels Flammenionisationsdetektor (53, 191, 194) oder Massenspektrometer (30, 191, 194) nach gaschromatographischer Vortrennung ermöglicht. Jedoch erweist sich bei diesen Verfahren die Darstellung des flüchtigen Kreatinin-Derivates hinsichtlich Reproduzierbarkeit und/oder Handhabung bisher noch als problematisch (s. Kap. 2.2.4.).

2.2. ENTWICKLUNG EINER NEUEN ULTRA-MIKROMETHODE ZUR KREATININBESTIMMUNG

Die in der Literatur zur Ultra-Mikrobestimmung empfohlenen Verfahren (s. Kap. 2.1.) können teils aus methodischen, teils aus technischen Gründen nicht zur Kreatininbestimmung in der Perilymphe herangezogen werden. Zur Entwicklung einer neuen, zuverlässigen Bestimmungsmethode wurden daher zunächst die verschiedenen gängigen Analyseverfahren hinsichtlich ihrer Eignung für 3 - 5 µl Perilymphe untersucht. Setzt man voraus, daß die Kreatinin-Konzentration in der Perilymphe weitgehend der Serum-Kreatininkonzentration entspricht (263), - bei enzymatischer Bestimmung des Kreatinins mit Creatinin-Amido-Hydrolase wurde im Normalserum eine mittlere Kreatinin-Konzentration von 67 µmol/l (Frauen: 42 - 80 µmol/l; Männer: 49 - 97 µmol/l) gefunden (292) - so muß diese Nachweisreaktion mindestens eine Kreatininmenge von 23 - 38 ng Kreatinin/Probe (= 201 - 335 pmol Kreatinin) und im günstigsten Falle 14 - 24 ng Kreatinin/Probe (= 126 - 210 pmol Kreatinin) erfassen können.

2.2.1. Experimentelles

Der Kreatinin-Nachweis wurde mit verschiedenen Analyse-Verfahren in wässrigen Standardlösungen mit unterschiedlicher Kreatininkonzentration durchgeführt und jeweils die untere Nachweisgrenze bestimmt.

Reagenzien und Lösungen:

Es wurden frisch angesetzte wässrige Kreatinin-Standardlösungen (Kreatinin, Merck 5208) mit einer Konzentration von 0,025 bis 0,5 mmol/l Kreatinin verwendet. Das Probevolumen betrug stets 5 µl. Der Reinheitsgrad der verwendeten Reagenzien war p.A.

a) Fluorimetrie:

Dansylierung:

1. 5 µl Standard + 5 µl $NaHCO_3/H_2O$ (50 mmol/l) + 5 µl Dansylchlorid/Aethanol (1,0 mmol/l)
2. 5 µl Standard + 5 µl Triaethylamin + 5 µl Dansylchlorid/Aethanol (1,0 mmol/l)
3. 5 µl Standard + 5 µl Dansylchorid/N,N-Di-iso-propylaethylamin (1,0 mmol/l)

Die Anregung der Fluorescenz erfolgte mit einer UV-Lampe (Desaga UVIS) bei 254 nm.

b) Dünnschichtchromatographie:

Es wurden DC-Fertigplatten Kieselgel 60 (Merck) und Cellulose MN 300 (Macherey & Nagel), Schichtdicke 0,25mm, mit und ohne Fluorescenz-Indikator (F_{254}) verwendet.

Jaffe-Reagenz: methanolische Lösung von Pikrat (10 mmol/l) und NaOH (0,5 mol/l)

c) Gaschromatographie:

Die Silylierung wurde mit N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (Serva) in einer weitgehend wasserdampffreien stickstoffhaltigen Atmosphäre durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit

einem Gaschromatographen (Varian Aerograph 200) mit FID.

d) Die spektralphotometrischen Untersuchungen wurden im Einstrahlverfahren mit einem Spektralphotometer Beckman DU und im Doppelstrahlverfahren mit einem Spektralphotometer Beckman DK-2A durchgeführt. Es wurden Küvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm (Gesamtvolumen 3,5 ml) und 1 mm (Gesamtvolumen 100 µl) sowie eine Durchflußmikroküvette mit 15 µl Gesamtvolumen (Schichtdicke 10 mm) verwendet. Die Messungen erfolgten im thermostatisierten Küvettenhalter.

2.2.2. Fluorimetrie

Eine deutliche Steigerung der Nachweisempfindlichkeit kann allgemein durch fluorimetrische Bestimmung erreicht werden. Kreatinin bildet zwar mit Ninhydrin/NaOH eine fluorescierende Verbindung, jedoch ist dieses Verfahren für eine Ultra-Mikrobestimmung nicht geeignet, da:

a. andere Verbindungen des Serums ebenfalls mit Ninhydrin/NaOH unter Bildung fluorescierender Molekülkomplexe reagieren, deren Fluorescenzspektrum einen ähnlichen Verlauf zeigt wie das Fluorescenzspektrum der mit Kreatinin gebildeten Verbindung (27),

b. die Fluorescenzintensität des mit Kreatinin gebildeten Kondensationsproduktes gering ist. Auf der Dünnschichtplatte wurde eine untere Nachweisgrenze von 20 µg Kreatinin/Probe gefunden (27).

Trotz eingehender Untersuchungen konnte von uns keine Verbindung gefunden werden, die selektiv mit Kreatinin ein fluorescierendes Kondensationsprodukt bildet.

2.2.3. Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Abtrennung des Kreatinins erfolgte auf Kieselgel- und Cellulose-Platten, wobei mit n-Propanol/20% Ammoniak/H_2O (73 : 20 : 7) (27) chromatographiert wurde. Die Proben wurden mit einer Mikropipette punktförmig aufgetragen. Der quantitative Kreatinin-Nachweis wurde auf dem Träger mit der Jaffé-Reaktion und mit Jod durchgeführt, da sich - wie Vorversuche zeigten - die anderen in Frage kommenden Methoden für einen empfindlichen Kreatinin-Nachweis nicht eigneten.

a. Bei Anfärben mit methanolischer, alkalischer Pikratlösung wurde eine untere Nachweisgrenze von 100 ng Kreatinin/Probe gefunden. Der mit alkalischer Pikratlösung gebildete Farbkomplex des Kreatinins ist jedoch sowohl auf Kieselgel als auch auf Cellulose sehr instabil, wodurch die Reproduzierbarkeit der quantitativen Kreatininbestimmung auf dem Träger mit der Jaffé-Reaktion stark eingeschränkt wird.

b. Im basischen Milieu lagert sich Jod unter Ausbildung eines farbigen Molekülkomplexes labil an Kreatinin an. Die Anlagerung erfolgt vermutlich an der Iminogruppe. Zum Kreatinin-Nachweis wurde die Dünnschichtplatte zuerst mit einer 2%-Lösung von J_2 in $CHCl_3$, anschließend mit tert. Butylamin besprüht. Bei Entfernen des überschüssigen J_2 durch vorsichtiges Abdunsten und nachfolgender Extraktion mit $CHCl_3$ wird der Kreatininfleck durch das angelagerte Jod sichtbar.

Sowohl die direkte Erfassung des farbigen Molekülkomplexes wie auch der Nachweis des angelagerten Jod ergaben jedoch keine Steigerung der Nachweisgrenze. Daher wurde von einer Weiterentwicklung des dünnschichtchromatographischen Kreatinin-Nachweises Abstand genommen.

2.2.4. Gaschromatographie

Bei den Verfahren, die bisher zur gaschromatographischen Bestimmung des Kreatinins beschrieben wurden, wird Kreatinin teils durch Silylierung, überwiegend jedoch durch Acylierung in ein thermisch stabiles, flüchtiges Derivat überführt. Die Acylierung wurde mit Trifluoressigsäureanhydrid (30, 53, 194), die Silylierung mit N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (53) bzw. mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (191) durchgeführt. Von CANCALON (53)wurde zur Darstellung des flüchtigen Derivates Acylierung und Silylierung kombiniert angewendet. BJÖRKHEM et al. (30) überführten Kreatinin zur Acylierung zuerst in ein 3-Aethylderivat (3-(2-Hydroxy, 2-Methyl)-Aethylkreatinin).

Die Darstellung des Trifluoracetylderivates des Kreatinins mit Trifluoressigsäureanhydrid gelingt nicht immer quantitativ vollständig, wie Untersuchungen von BJÖRKHEM et al(30) ergaben. Wir stellten daher das flüchtige Kreatinin-Derivat durch Silylierung dar. Als Silylgruppendonator wurde N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (BSA) verwendet, das sowohl eine Silylierung der Hydroxylgruppe der Enolform als auch der basischen Amino- bzw. Iminogruppe des Kreatinins (s. Kap. 1.2.1.) ermöglicht. Da sich die Trimethylsilylgruppe rasch an die enolische Hydroxylgruppe anlagert, werden Verbindungen, bei denen eine Keto-Enol-Tautomerie möglich ist, bei Reaktion mit BSA in die Enolform überführt.

Zur Silylierung wurde der in Kapillaren eingegebene Standard bzw. die enteiweißte Serumprobe nach Trocknung mit einer - im Verhältnis zur Kreatininkonzentration - vierzigfachen molaren Menge an BSA, unter Zugabe einer katalytischen Menge (5 %) von Trimethylchlorsilan, versetzt. Hiermit wurde bei allen Ansätzen eine ausreichende Silylierungskapazität erreicht. Nach Zuschmelzen der

Kapillaren wurde der Reaktionsansatz für 45 Min. bei 70°C erhitzt. Grundvoraussetzung für eine quantitativ vollständige Silylierung ist der absolute Ausschluß von Feuchtigkeit - sowohl im Reaktionsansatz als auch bei der Versuchsdurchführung -, da das Silylierungsmittel und das silylierte Derivat extrem hydrolyseempfindlich sind.

Für die gaschromatographischen Untersuchungen der Silylierungsprodukte wählten wir folgende Anordnung:
Gaschromatograph: Varian Aerograph 200; Säule: Silicongummi SE 30, 20 % auf Chromosorb; 1,5 m x 3/8 in. äußerer Durchmesser; Temperaturen: Einspritzblock ca. 120°C, Detektor 175°C, Ofen programmiert von 50 - 175°C mit einer Anstiegsrate von 15°C/Min.; Initialtemperatur: 50°C; Trägergas: N_2, ca. 40 ml/Min.; Detektor: Flammenionisationsdetektor.

Die Kreatininbestimmung nach gaschromatographischer Trennung ergab bei ausreichender Empfindlichkeit und guter Reproduzierbarkeit in einem weiten Konzentrationsbereich eine lineare Beziehung zwischen der Kreatininkonzentration und der Fläche des entsprechenden Peaks im Chromatogramm.

Es zeigte sich jedoch, daß Kreatin bei der Silylierung quantitativ vollständig in Kreatinin umgewandelt wird. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Lactamisierung des Kreatins sowohl durch die ausgeprägte Tendenz des Silylierungsmittels, rasch mit aktivem Wasserstoff zu reagieren, als auch durch das zur Silylierung erforderliche zusätzliche Erhitzen der Probe, das unter streng wasserfreien Bedinungen erfolgen muß, begünstigt wird. Daher konnte die gaschromatographische Bestimmung des silylierten Kreatinin-Derivates nicht zum quantitativen Kreatinin-Nachweis bei der hier vorliegenden Fragestellung verwendet werden.

2.2.5. Untersuchungen zur Kreatininbestimmung mit Polynitroaromaten

Unter der Annahme, daß die Jaffé-Reaktion ein Sonderfall der allgemeinen Farbreaktion ist, die zwischen Polynitroaromaten, α-Methylenketoverbindungen und Basen eintritt (s. Kap. 4.2.2.), wurde versucht, durch Ersatz des Pikrates durch andere Polynitroaromate sowie durch Variation der Reaktionsbedingungen(Base, Milieu) einen Reaktionsansatz zu finden, der eine weitgehend spezifische Bestimmung des Kreatinins im Nanogramm-Bereich mit einer Farbreaktion ermöglicht. Hierzu wurde die Reaktion verschiedener aromatischer Nitroverbindungen mit Kreatinin in alkalischem Milieu überprüft.

Es wurden Polynitroaromate ausgewählt, die aufgrund ihrer Konfiguration bei Adduktbildung mit Kreatinin eine - im Vergleich zu Pikrat - größere Variation der mesomeren Strukturen und damit eine stärkere Lichtabsorption des Systems erwarten lassen. Hierdurch kann evtl. bei der Reaktion mit Kreatinin eine größere Farbintensität erreicht werden, als bei der Jaffé-Reaktion.

Bei 2,4,6-Trinitro-m-kresol;4,6-Dinitro-o-kresol und bei Pikraminsäure wurde nach NaOH-Zugabe keine Reaktion mit Kreatinin beobachtet. Dagegen reagierten die nachfolgenden Nitroaromate mit Kreatinin in wässrigem, alkalischem Milieu unter Bildung farbiger Molekülkomplexe, wobei die Absorptionsmaxima der längerwelligen Bande der hierbei entstehenden Addukte im Bereich zwischen 460 nm und 540 nm lagen und eine unterschiedliche Intensität zeigten: 3,5-Dinitrobenzonitril; 2,4,6-Trinitroresorcin; 2,4,5,7-Tetranitro-1,8-dihydroxyanthrachinon; 2,4,6-Trinitrotoluol; 2,4-Dinitro-1-naphthol; 2,6-Dinitrohydrochinon-4-monoacetat; 3,5-Dinitrosalicylsäure (die Reihenfolge der Aufzählung entspricht der Abnahme der Absorptionsintensität).

Bei allen Nitroverbindungen war der Extinktionskoeffizient des Adduktes im Bereich des Maximums der längerwelligen Bande geringer als bei Pikrat. Durch Veränderung des Milieus wurde bei einigen Nitroaromaten eine Zunahme des Extinktionskoeffizienten erzielt. Diese war jedoch in den meisten Fällen gering. Lediglich bei der Reaktion von Kreatinin mit 3,5-Dinitrobenzonitril (DNBN) konnte in aethanolisch-wässriger Lösung eine deutliche Steigerung der Farbintensität erreicht werden. Daher wurde diese Reaktion hinsichtlich ihrer Eignung zur quantitativen Kreatininbestimmung untersucht.

2.2.6. Kreatininnachweis mit 3,5-Dinitrobenzonitril

Für die Mikorbestimmung des Kreatinins mit DNBN in aethanolisch-wässriger Lösung (Aethanol/H_2O (3 : 1)) erwies sich folgender Reaktionsansatz am günstigsten:

5 µl enteiweißte Probe + 10 µl Aethanol + 20 µl DNBN/Aethanol (15 mmol/l) + 5 µl $NaAsO_2/H_2O$ (0,38 mol/l)

Das Absorptionsmaximum der längerwelligen Bande des farbigen Reaktionsproduktes von DNBN mit Kreatinin liegt bei 525 nm ($\varepsilon_{525} = 4,5 \pm 0,18 \times 10^6\ cm^2 mol^{-1}$). Die Reaktion zeigt eine der Jaffé-Reaktion analoge Kinetik, wobei jedoch dE/dt wesentlich geringer ist. Bei einer Reaktionstemperatur von 30 - 35°C ist die Umsetzung unter den hier gewählten Reaktionsbedingungen erst nach 240 Min. weitgehend abgeschlossen. Es fand sich in einem ausreichend großen Konzentrationsbereich eine lineare Beziehung zwischen Kreatinin-Konzentration und Absorption bei 525 nm. Die Proteinfällung erfolgte thermisch. Die anschließende Zugabe von Aethanol hat hinsichtlich der Enteiweißung einen positiven Nebeneffekt, da hierdurch auch Proteinspuren, die evtl. bei der thermischen Enteiweißung nicht mit erfaßt wurden, nachgefällt werden.

Die quantitative Kreatininbestimmung mit DNBN bringt folgende Vorteile mit sich:

1. der Anteil der Absorption des Nitroaromaten an der Gesamtabsorption ist gering, da das Absorptionsmaximum des Reaktionsproduktes mit Kreatinin sehr weit im langwelligen Bereich liegt ;
2. durch Einstellung des alkalischen pH mit $NaAsO_2$ (K_{Diss/H_2O}: 6×10^{-10}) als Puffer wird eine pH-Stabilisierung im Meßansatz und damit eine Erhöhung der Reproduzierbarkeit erreicht;
3. durch die thermische Eiweißfällung und Nachfällung mit Aethanol entfällt die bei Verwendung von Säuren erforderliche Neutralisation des Fällungsmittels.

Das Verfahren hat jedoch folgende Nachteile:

1. DNBN reagiert außer mit Kreatinin auch mit einem Teil der bei der Jaffé-Reaktion interferierenden Verbindungen (s. Kap. 6.1.1.) unter Bildung farbiger Molekülkomplexe, die ebenfalls bei 525 nm absorbieren, so daß es bei Kreatininbestimmung im Serum zu einer Beeinflussung der Meßwerte durch Interferenz kommt.
2. Die Reaktion läuft sehr langsam ab. Da die Interferenz der mitreagierenden Verbindungen einige Zeit nach Start der Reaktion zu einer kontinuierlichen Extinktionszunahme führt, kann die Extinktion am Endpunkt der Umsetzung von DNBN mit Kreatinin nur unzureichend beurteilt werden.

Bei größerem Probevolumen stellt der quantitative Kreatininnachweis mit DNBN eine Alternative zur Jaffé-Reaktion dar. Jedoch bietet dieses Verfahren gegenüber der Bestimmung mit Pikrat vergleichsweise wenig Vorteile. Der für diese Nachweisreaktion gefundene Extinktionskoeffizient ermöglicht nur bedingt eine Ultra-Mikrobestimmung, da er bei einem Probevolumen von 3-5 µl zu

niedrige Extinktionswerte liefert, wodurch erhebliche Meßfehler auftreten können. Da durch Reduzierung des Gesamtvolumens des Meßansatzes keine Zunahme der Extinktion erreicht werden konnte - eine Verminderung des Aethanol-Anteils führte zu einer Abnahme der Absorption - und der Extinktionskoeffizient durch verschiedenste Reaktionsbedingungen nicht verbessert werden konnte, wurde versucht, eine Ultra-Mikromethode zur quantitativen Kreatininbestimmung mit der Jaffé-Reaktion zu entwickeln.

2.3. KREATININBESTIMMUNG IN DER PERILYMPHE MIT DER JAFFÉ-REAKTION

Um eine photometrische Bestimmung mit ausreichender Meßgenauigkeit durchführen zu können, sollte die Extinktion des Meßansatzes bei nicht digitalisierten Geräten mindestens 0,3 betragen.- Optimale Genauigkeit wird bei einer Transmission von 0,5 erreicht.- In der Perilymphe wird, wie bereits ausgeführt, eine mittlere Kreatinin-Konzentration von 67 µmol/l erwartet (s. Kap.: 2.2.). Die risikolos entnehmbaren 3 - 5 µl Perilymphe enthalten damit ungefähr 201 - 335 pmol Kreatinin. Die für die Messung zur Verfügung stehenden Durchfluß-Mikroküvetten haben ein Gesamtvolumen von 15 µl, bei einer Schichtdicke von 1 cm. Somit wäre für die Nachweisreaktion ein Extinktionskoeffizient von $1,34 \times 10^7$ bis $2,23 \times 10^7$ cm^2/mol zu fordern. Derartig hohe Extinktionskoeffizienten sind jedoch bei Nachweisreaktionen relativ selten.

Bei den bisher beschriebenen Bestimmungsverfahren, die auf der Jaffé-Reaktion beruhen, wurde ein Extinktionskoeffizient von $5,6 \times 10^6$ bis $9,1 \times 10^6$ cm^2/mol (s. Kap. 1.5.1.) gefunden. Um die Jaffé-Reaktion zur Ultra-Mikrobestimmung des Kreatinins heranziehen zu können, ist es daher erforderlich, Reaktions- und

Meßbedingungen zu finden, bei denen ein größtmöglicher Extinktionskoeffizient erhalten wird. Weiterhin bereiten neben den allgemein bei Ultra-Mikrobestimmungen auftretenden Problemen, die u.a. aus der Verschiebung des Verhältnisses zwischen Oberfläche und Volumen sowie aus dem zunehmenden Einfluß der Oberflächenspannung resultieren, bei Anwendung der Jaffé-Reaktion folgende methodische Probleme erhebliche Schwierigkeiten:

1. die starke Leerwertabsorption;
2. die Absorptionsmessung in einem Wellenlängenbereich, in dem $dE/d\lambda$ sowohl bei dem Leerwert, als auch bei dem farbigen Reaktionsprodukt sehr groß ist;
3. die Instabilität des Reaktionsproduktes;
4. das Vorliegen eines Multikomponentensystems; d.h. im Meßansatz laufen verschiedene, z.T. miteinander konkurrierende Reaktionen nebeneinander ab;
5. die extreme Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes von den Reaktionsbedingungen (Milieu, Temperatur) und dem Verhältnis der Reaktanten (Kreatinin, Pikrat, NaOH) zueinander;
6. die starke Zeitabhängigkeit des Reaktionsablaufes;
7. die Mitreaktion anderer Verbindungen des Serums;
8. die Enteiweißung, sowie ihr Einfluß auf das Milieu des Meßansatzes.

Um eine "Verbesserung" des Extinktionskoeffizienten des Meßansatzes bei gleichzeitig guter Reproduzierbarkeit der Meßwerte zu erreichen, wurden der Reaktionsmechanismus der Jaffé-Reaktion sowie die o.g. methodischen Probleme im folgenden untersucht.

3. DIE REAKTIONSPARTNER BEI DER JAFFÉ-REAKTION

3.1. VERHALTEN VON KREATININ IM SAUREN UND ALKALISCHEN MILIEU

3.1.1. Methodik

1. pH-Einfluß auf das UV-Spektrum des Kreatinins:

a) 2 ml wässrige Kreatininlösung (0,2 mmol/l) + 2 ml HCl (200 mmol/l; 2 mmol/l; 0,02 mmol/l)

b) 2 ml wässrige Kreatininlösung (0,2 mmol/l) + 2 ml NaOH (200 mmol/l; 2 mmol/l; 0,02 mmol/l)

Die Messungen erfolgten jeweils 3 Min. nach Zugabe von HCl bzw. NaOH zur Kreatininlösung.

Zur Aufzeichnung des Absorptionsspektrums in wässriger, neutraler Lösung wurde eine 100 µmol/l Kreatininlösung sowie eine 100 µmol/l Kreatinlösung verwendet.

Wellenlängenbereich: 186 nm - 260 nm; Referenzlösung war das jeweilige Lösungsmittel; Schichtdicke: 10 mm.

2. Änderung der Absorption einer wässrigen Kreatininlösung in Abhängigkeit von NaOH-Konzentration und Zeit:

Kreatinin-Konzentration im Meßansatz: 90,14 µmol/l; 98,87 µmol/l; 100 µmol/l; 100,06 µmol/l; 100,09 µmol/l; 101,97 µmol/l;

NaOH-Konzentration im Meßansatz: 0,0600 mol/l; 0,1798 mol/l; 0,6560 mol/l; 1,6090 mol/l; 6,0530 mol/l.

Das Absorptionsspektrum wurde im Bereich von 225 - 260 nm zu definierten Zeiten nach NaOH-Zugabe zur Kreatininlösung gemessen. Referenzlösung: H_2O/NaOH; Schichtdicke: 10mm.

3. Hydrolyse des Kreatinins:

2 ml Kreatinin (0,2 mmol/l) + 2 ml NaOH (200 mmol/l)
Die Änderung der Absorption wurde bei 240 nm bestimmt;
Referenzlösung: NaOH (100 mmol/l).

Die Reaktions- und Meßtemperatur betrug bei allen Untersuchungen 25°C.

3.1.2. UV-Spektrum von Kreatinin

Das UV-Spektrum von Kreatinin weist in wässriger, neutraler Lösung zwei Banden auf (Abb. 1), wobei die kürzerwellige Bande (= Bande A; Maximum: 201 nm; $\varepsilon = 12,3 \cdot 10^6$ cm^2/mol) der Guanidinogruppe und die längerwellige Bande (= Bande B; Maximum: 233 nm; $\varepsilon = 6,6 \cdot 10^6$ cm^2/mol) der Säureamidgruppe zugeordnet wird (20).

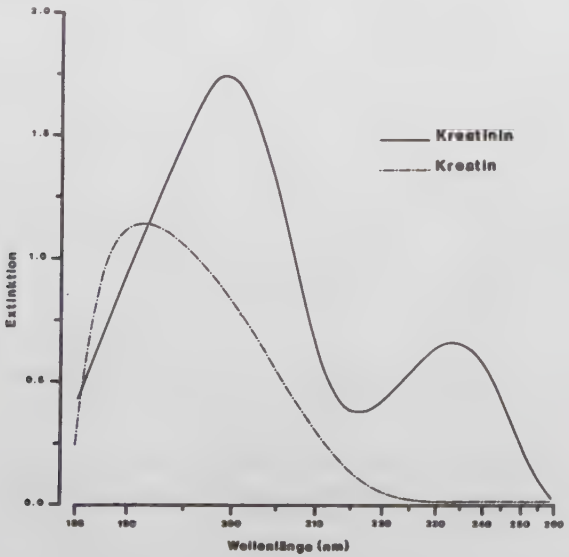


Abb. 1: Absorptionsspektrum von Kreatinin (0,1 mmol/l) und Kreatin (0,1 mmol/l) in wässriger, neutraler Lösung.

Der Verlauf des Spektrums ist pH-abhängig (Abb. 2; Abb. 3). Dies deutet darauf hin, daß sowohl im sauren, wie auch im basischen Milieu An- oder Umlagerungen an der Guanidino- bzw. Säureamid-Gruppe zu erwarten sind.

3.1.3. Kreatinin im sauren Milieu

Bei zunehmender Acidität tritt eine hypsochrome Verschiebung und eine Hypochromie der A-Bande auf (Abb. 2), was auf die Bildung eines Guanidinium-Kations zurückgeführt werden kann. Hierdurch werden die Resonanzfähigkeit der π-Elektronen und damit die für die Lichtabsorption erforderlichen Elektronenübergänge (315) reduziert.

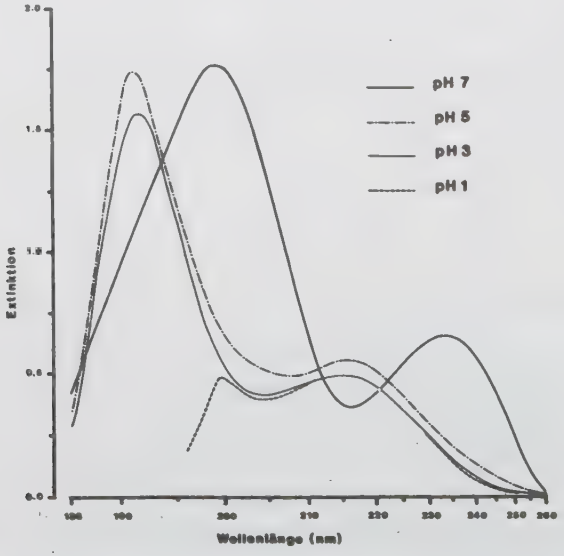
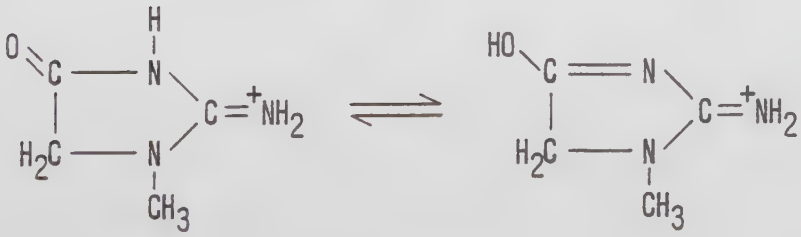


Abb. 2: Absorptionsspektrum von Kreatinin (0,1 mmol/l) im sauren Milieu (pH-Bereich: 1 - 7) (HCl-Konzentration: 100 mmol/l; 1 mmol/l; 0,01 mmol/l)

Die Extinktionsabnahme und hypsochrome Verschiebung der B-Bande könnte zwar auch Folge der Bildung des Guanidinium-Ions sein, wird jedoch vermutlich durch die Anlagerung eines Protons an den Sauerstoff der Carbonylgruppe bedingt. Von KOWALSKY und RATNER (180) war für Guanidino-Anhydride allgemein eine derartige Protonen-Anlagerung im sauren Milieu angenommen worden. Wegen des raschen Austausches mit den Protonen des Lösungsmittels konnte jedoch bisher im ^{1}H-NMR-Spektrum eine Protonenanlagerung an das Kreatinin im sauren Medium nicht nachgewiesen werden.

Da in einer stark salzsauren Kreatininlösung dünnschichtchromatographisch zwei gleich große Fraktionen mit unterschiedlichem Rf-Wert nachgewiesen wurden (20), ist anzunehmen, daß Kreatinin hier nur zum Teil als Kreatininium-Ion(I) bzw. in der tautomeren Form (Kreatininium-Ion II) vorliegt und sich bei höherer Wasserstoffionen-Konzentration noch ein weiteres Proton anlagern kann.



I II

(Kreatininium-Ion)

Untersuchungen zum Einfluß der Ionenstärke des Lösungsmittels auf die Struktur des Kreatinins (20) ergaben Hinweise dafür, daß Kreatinin auch bei physiologischem pH aufgrund der Ionenkonzentration der Körperflüssigkeiten zum Teil als Kation vorliegt.

3.1.4. Kreatinin im alkalischen Milieu

Im alkalischen Milieu ist keine Veränderung an der Guanidinogruppe(A-Bande) zu erwarten. Dagegen findet sich bei der Säureamid-Bande(B-Bande) bis pH 11 eine geringe Zunahme des Extinktionskoeffizienten und bei weiterem Anstieg der Basizität zunächst eine hypsochrome Verschiebung, die mit einer deutlichen Zunahme der Absorptionsintensität verbunden ist (Abb. 3). Ein Anstieg der OH^--Konzentration über 1,5 mol/l führt dann wieder zu einer bathochromen Verschiebung der Säureamid-Bande, bei gleichzeitiger Hypochromie.

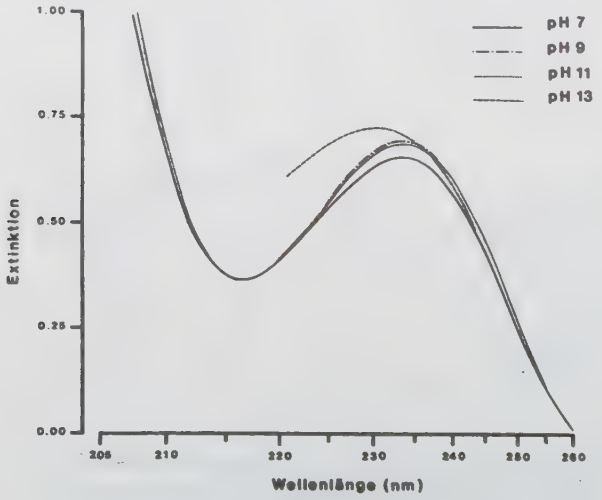


Abb. 3: Absorption von Kreatinin (0,1 mmol/l) im Bereich der "Säureamidbande" in Abhängigkeit vom pH der Lösung (pH-Bereich: 7 - 13)

Die Veränderung der Säuremid-Bande in alkalischem Milieu ist auf die Bildung eines Kreatinin-Anions zurückzuführen (s. Kap. 1.2.2.).
Bei ^{1}H-NMR-Untersuchungen wurde unmittelbar nach NaOD-Zugabe zu Kreatinin in Abhängigkeit von der Basenkonzentration ein mehr oder minder rascher Austausch der Protonen an der Methylengruppe durch das Deuterium des Lösungsmittels beobachtet (49, 160, 308).
Für den Protonenaustausch wurde bei einem pD von 9 eine Halbwertszeit von 7 Stunden gefunden (160).

Im ^{13}C-NMR-Spektrum des Kreatinins fällt in alkalischem Milieu eine Rückbildung des Resonanz-Signals des Kohlenstoffs der Methylengruppe auf, was auf den Austausch der Methylen-Protonen durch Deuterium zurückgeführt werden kann (s.o.). Außerdem wurde eine Verschiebung der Resonanz-Signale des Kohlenstoffs der Carbonylgruppe gefunden, verbunden mit einer geringen Intensitätsabnahme (308).
Weitere Veränderungen der Bindungsverhältnisse der anderen C-Atome des Kreatinins wurden in alkalischem Milieu nicht beobachtet (308).

Nach Abspaltung eines Protons von der Methylengruppe kann sich entweder ein Kreatinin-Carbanion mit Resonanzstabilisierung durch die benachbarte Carbonylgruppe bilden, oder es kommt zu einer Elektronenverschiebung zu dem Carbonyl-Sauerstoff hin, wodurch ein Carbonyl-Anion entsteht. Ein derartiger Elektronenübergang mit Ausbildung eines Carbonyl-Anions und einer Doppelbindung zwischen C-4 und C-5 wurde vonUEDA (301) durch Elektronen-Spin-Resonanz-Untersuchungen an Kreatinin-Radikalen nachgewiesen, die durch Bestrahlung erzeugt wurden. Die im ^{13}C-NMR im alkalischen Milieu beobachtete Verschiebung der

Resonanz von C-4 bei gleichzeitig nur geringer Intensitätsänderung (308) deutet eher auf eine Ladungsverschiebung bei Resonanzstabilisierung und somit auf Bildung eines Kreatinin-Carbanions als auf Ausbildung einer Doppelbindung hin.

Zur Überprüfung, welche Veränderungen Kreatinin im alkalischen Milieu erfährt, wurde die zeitliche Änderung der Extinktion im Bereich der Säureamid-Bande in Abhängigkeit von der NaOH-Konzentration bestimmt.

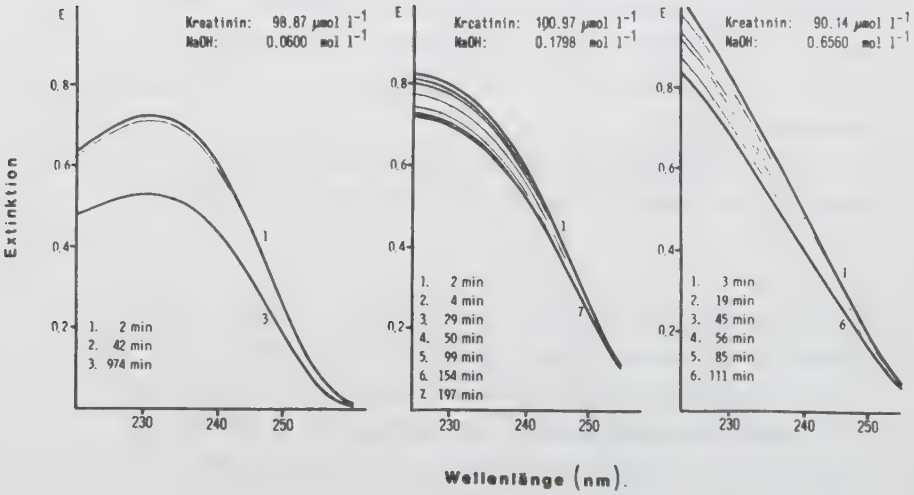


Abb. 4: **Einfluß der NaOH-Konzentration auf den Verlauf der Absorption einer wässrigen Kreatininlösung im Bereich der Säureamid-Bande in Abhängigkeit von der Zeit.**

Es zeigt sich, daß es bei Basenzugabe zu einer wässrigen Kreatininlösung außer zu der oben beschriebenen Verschiebung der Säureamid-Bande zu einer allmählichen Abnahme der Absorptionsintensität im gesamten Wellenlängenbereich dieser Bande kommt (Abb. 4). Die Bestimmung der Extinktion einer wässrigen Kreatininlösung bei 240 nm in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen NaOH-Konzentrationen (Abb. 5) ergab:

1. Der Ausgangsextinktionskoeffizient ist von der Basenkonzentration abhängig. Steigende Basenkonzentration führt zunächst zu einer Abnahme des Extinktionskoeffizienten, der jedoch bei weiterem Anstieg der NaOH-Konzentration wieder zunimmt. - Die Bestimmung der Ausgangsextinktion erfolgte 2 Minuten nach NaOH-Zugabe. -

2. Nach Basenzugabe tritt eine kontinuierliche Abnahme der Absorption auf, wobei dE/dt der NaOH-Konzentration direkt proportional ist.

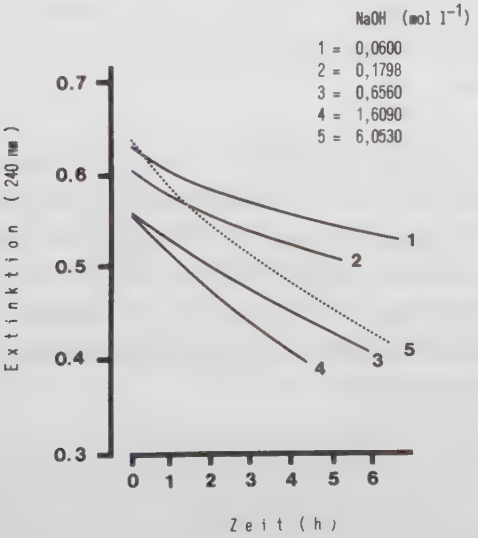


Abb. 5: Änderung der Absorption einer wässrigen Kreatininlösung (0,1 mmol/l) bei 240 nm in Abhängigkeit von der NaOH-Konzentration und der Zeit.

Die anfängliche Abnahme des Ausgangsextinktionskoeffizienten (ε_{240}) bei steigender NaOH-Konzentration ist auf die hypsochrome Verschiebung der Säureamid-Bande zurückzuführen, die Folge der Protonenabspaltung von der Methylengruppe und damit Hinweis für den Anteil des Kreatinin-Anions in der Lösung ist. Die erneute Zunahme des Extinktionskoeffizienten bei weiterem Anstieg der Basenkonzentration wird vermutlich durch die Abspaltung des zweiten Protons von C-5 bedingt. In dem hierbei entstehenden Anion kann es durch Elektronenverschiebung zur Ausbildung einer Doppelbindung zwischen C-5 und N-1 kommen, die dann zu einer bathochromen Verschiebung der Säureamid-Bande führt.

Die Abhängigkeit des Ausgangsextinktionskoeffizienten von der NaOH-Konzentration ist ein Hinweis dafür, daß:

a) sich das Gleichgewicht zwischen Kreatinin und dem Kreatinin-Anion rasch einstellt;

b) der Anteil des Kreatinin-Anions von der NaOH-Konzentration abhängig ist und mit steigender NaOH-Konzentration zunimmt.

Wird der von BUTLER (49) für die Methylengruppe ermittelte pKa-Wert von 12,7 zugrundegelegt, so sind bei einem pH von 10 nur 2‰ des vorhandenen Kreatinins in Kreatininat umgewandelt, bei pH 11 sind es bereits ungefähr 2 %, bei pH 12 ca. 7 % und bei pH 14 liegen ca. 95,2 % des Kreatinins als Kreatininat vor. Damit wird die Bedeutung des alkalischen Milieus für die Jaffé-Reaktion ersichtlich.

Die nach der NaOH-Zugabe auftretende konstante Extinktionsabnahme wird durch die Hydrolyse des Kreatinins bedingt, wobei die Geschwindigkeit von der OH^--Konzentration abhängig ist. Bei einer NaOH-Konzentration von 0,1 mol/l wurde für die Hydrolyse

des Kreatinins bei 25°C eine Halbwertszeit von ca. 14,5 Stunden gefunden.

3.2. DIE REAKTION VON PIKRINSÄURE MIT NaOH

Die Dissoziationskonstante von Pikrinsäure beträgt bei 20°C 0,381 (pka = 0,419)(120) und bei 25°C 0,471 (pKa = 0,327) (145). Unter Berücksichtigung des Aktivitätskoeffizienten nach Debye-Hückel-Onsager ergibt sich, daß Pikrinsäure bei pH 7 in einem Milieu der Ionenstärke von 1,18 zu 99,999 % dissoziiert ist. Pikrinsäure liegt damit als starke Säure aufgrund ihrer hohen DK in wässriger und schwach alkalischer Lösung weitgehend dissoziiert vor.

Da die Jaffé-Reaktion erst bei pH-Werten über 7 abläuft, ist vermutlich nicht Pikrat, sondern ein sich im alkalischen Milieu bildendes Folgeprodukt des Pikrates der Reaktionspartner des Kreatinins.

Untersuchungen des Pikratspektrums im alkalischen Milieu ergaben bei steigender NaOH-Konzentration:

1. eine bathochrome Verschiebung der Pikratbande - bei pH 7 liegt das Maximum der Pikratbande bei 360 nm (1, 2, 104) - mit Ausbildung eines neuen Maximums bei 390 nm. In diesem Bereich nimmt die Extinktion mit der NaOH-Konzentration zu (2, 81, 104).
2. eine vorübergehende, d.h. nur bis zu einer gewissen NaOH-Konzentration auftretende Zunahme der Absorption im Wellenlängenbereich über 450 nm. Bei sehr hoher NaOH-Konzentration konnte im längerwelligen Bereich keine Absorptionszunahme mehr beobachtet werden (2, 81).

Die Veränderungen des Pikratspektrums in alkalischem Milieu werden auf die Reaktion von Pikrat mit Hydroxyl-Ionen zurückgeführt, wobei eine reversible, kovalente Anlagerung der OH^--Gruppe an das Pikrat unter Bildung eines sog. "Meisenheimer-Adduktes" angenommen wird (2, 81, 82, 103, 104).
CRAMPTON et al. (81) wiesen durch NMR-Untersuchungen bei hoher Basenkonzentration die Ausbildung eines Diadduktes mit kovalenter Anlagerung von OH^- an die beiden unsubstituierten Ring-C-Atome (C_3, C_5) des Pikrates nach. Kürzlich durchgeführte Untersuchungen (103) ergaben Hinweise für die Bildung eines Monoadduktes mit OH^--Anlagerung an C_3 und anschließender Ionisation der angelagerten Hydroxyl-Gruppe unter Ausbildung eines Trianions. Die Tendenz zur Ionisation der OH^--Gruppe nimmt hierbei mit der Basenkonzentration zu.

Neben der Adduktbildung wurde bei der Reaktion von Pikrat mit Basen eine Deprotonierung des Benzolringes unter Bildung eines Aryl-Carbanions gefunden (48, 78, 80). Diese Reaktion, die der OH^--Konzentration und der Temperatur direkt proportional ist (78, 80), verläuft jedoch sehr langsam und stellt im alkalischen Milieu eine unbedeutende Nebenreaktion dar (78).

3.2.1. Reaktionsmechanismen bei der Umsetzung von Nitroaromaten mit Basen

Allgemein kann es bei der Umsetzung aromatischer Nitroverbindungen mit Basen in polaren Lösungsmitteln 1. zur Anlagerung der Base an den Nitroaromaten unter Ausbildung eines σ-Komplexes (48, 287), 2. zu einer nucleophilen aromatischen Substitution (22, 48, 216), 3. zu einer Ausbildung von EDA-Komplexen (22) und 4. - als seltenere Möglichkeit - zu einer Deprotonierung des Aromaten (48, 78, 80) kommen. Die Art des Reaktionsweges hängt

hierbei von dem Grad der Nitro-Substitution und von der eingesetzten Base ab (48).

NMR-Untersuchungen (22, 48, 59, 80, 81, 82, 103, 176, 287) haben gezeigt, daß bei der Addition von Basen an 1-substituierte Trinitroaromate vorwiegend anionische σ-Komplexe gebildet werden. Als Modell für diese Untersuchungen wird hauptsächlich die Umsetzung von 2,4,6-Trinitroanisol (= Methylpikrat) mit Methanolat in methanolischer Lösung gewählt.

Es konnte nachgewiesen werden, daß bei der Anlagerung von Alkoholat-Ionen an 2,4,6-Trinitrophenolaether initial C_3-Addukte und erst anschließend im Verlaufe einer mehr inter- als intramolekularen Umlagerung langsam C_1-Addukte entstehen (21, 59, 79, 80, 287).

Diese Reihenfolge hat sterische Ursachen: Bei Basenanlagerung an C_1, d.h. an einem substituierten C-Atom, ist die sterisch erforderliche Ringspannung im Übergangszustand wesentlich größer, was in der unterschiedlichen Aktivierungsenergie für Bildung der C_1- und C_3-Addukte zum Ausdruck kommt (21). Die höhere Aktivierungsenergie für Bildung der C_1-Addukte - die Bestimmung der Aktivierungsenergie ergab für Bildung der C_3-Addukte einen Wert von ca. 10 kcal/mol (80) und für Bildung der C_1-Addukte einen Wert von ca. 13 kcal/mol (80) - muß u.a. für die erhebliche Deformation des Valenzwinkels im Übergangszustand aufgewendet werden (79, 80).

Da jedoch die Basenanlagerung an C_1 des Methyl-Pikrates, wie Kristallstruktur-Untersuchungen zeigten (302) durch das Herausdrehen des Substituenten an C_1 zu einer Verminderung der Ringspannung im Grundzustand führt (80, 287), resultiert daraus letzt-

lich für die C_1-Addukte eine größere thermodynamische Stabilität, als sie bei den C_3-Addukten vorliegt, so daß es zu einem allmählichen Überwiegen der C_1-Addukte über die C_3-Addukte kommt (21, 80, 287). Daher sind bei NMR-Untersuchungen im Reaktionsansatz von Methylpikrat mit Methanolat in Methanol überwiegend, bzw. fast nur C_1-Addukte nachzuweisen (80, 287). Nur bei sehr tiefer Temperatur konnte im NMR-Spektrum zuerst die Bildung der C_3-Addukte beobachtet werden (21, 269).

Der Ablauf der Anlagerung von Methanolat an Methyl-Pikrat kann unter gewissem Vorbehalt auf die Reaktion von Pikrat mit OH^- übertragen werden, wobei möglicherweise geringgradige Unterschiede im Reaktionsverhalten dadurch auftreten können, daß:

1. hinsichtlich der mitreagierenden Base Unterschiede bestehen; u.a. ist der Raumbedarf von OH^- kleiner als von Methanolat;
2. Pikrat als Anion vorliegt;
3. sich die Substituenten in C_1 von Methyl-Pikrat und Pikrat sowohl hinsichtlich der Größe als auch hinsichtlich des elektrostatischen Effektes unterscheiden.

Der Substituent in C_1 des Nitroaromaten beeinflußt die Position der Basenanlagerung einerseits durch seine negative Ladung und andererseits durch seine Größe,die zu unterschiedlichen sterischen Verhältnissen führt.

Durch den stärkeren positiv-induktiven und -mesomeren Effekt des negativ geladenen Substituenten in C_1 ist bei Pikrat an den unsubstituierten meta-Positionen des Ringes eine höhere Elektronendichte zu erwarten, als bei Methyl-Pikrat. An C_1 selbst kommt der positiv-induktive Effekt des Substituenten durch sterische Hinderung (182) bei Pikrat dagegen nur schwach zur Wirkung, so daß auch hier eine höhere Ladungsdichte zu erwarten ist als bei den Pikrinsäure-Estern, was sich für eine nucleophile Anlagerung

ungünstig auswirkt.

Bei den Analogiebetrachtungen ist weiterhin zu berücksichtigen, daß das Lösungsmittel einen grundlegenden Effekt auf den Reaktionsmechanismus und die Stabilität des Reaktionsproduktes haben kann (79, 80, 287). Die Untersuchungen zur Reaktion von Methyl-Pikrat mit Methanolat wurden in Methanol durchgeführt; bei der Jaffé-Reaktion erfolgt die Umsetzung von Pikrat mit OH^- dagegen in wässrigem Milieu.

Um Aufschluß darüber zu erhalten, welches Folgeprodukt des Pikrates für die Reaktion mit Kreatinin in Frage kommt, wurden von uns ergänzende Untersuchungen zur Reaktion von Pikrat mit OH^- durchgeführt.

3.2.2. Versuchsdurchführung

1. Untersuchungen zum Verlauf des Pikrinsäure- und Pikrat-Spektrums: Pikrinsäure 0,625 mmol/l gelöst in CCl_4, HCl (0,1 n; 8 n) sowie in jeweils frisch angesetzter, wässriger NaOH (0,1 - 6 mol/l)
   Wellenlängenbereich: 320 nm - 600 nm; Messung gegen Lösungsmittel; Schichtdicke: 1 mm

2. Untersuchungen zum Einfluß der OH^--Konzentration auf die Änderung der Absorption bei
   a) 485 nm: Meßansatz: 1 ml wässrige Pikratlösung (4,5 mmol/l bzw. 22,5 mmol/l) + 2 ml NaOH (0,15 - 12 mol/l)
   b) 388 nm: Meßansatz: 1 ml wässrige Pikratlösung (1,875 mmol/l) + 2 ml NaOH (0,15 - 12 mol/l)

Die Untersuchungen wurden bei einer Reaktions- und Meßtemperatur von 35°C durchgeführt; Bestimmung der optischen Dichte 10 Min. nach Zusammengeben der Lösungen; Schichtdicke: 1 mm.

3.2.3. Einfluß der OH^--Konzentration auf das Absorptionsspektrum

3.2.3.1. Verlauf des Spektrums

Das Absorptionsspektrum von Pikrinsäure in wässriger Lösung (Abb. 6) zeigt im sichtbaren Bereich eine Absorptionsbande mit Maximum bei 355 nm ($\varepsilon = 1,49 \cdot 10^7$ cm^2/mol). Dieses Spektrum muß dem Pikrat-Ion zugeordnet werden, da Pikrinsäure in wässriger Lösung weitgehend dissoziiert ist. Um das Spektrum des Pikrinsäure-Moleküls zu erhalten, wurden die Messungen in CCl_4 sowie - um die Dissoziation zurückzudrängen - in konz. HCl (8 n) durchgeführt. Das Maximum des Absorptionsspektrums der Pikrinsäure zeigt im sichtbaren Bereich in CCl_4 eine Bande mit Maximum bei 335 nm ($\varepsilon = 4,2 \cdot 10^6$ cm^2/mol) und in HCl eine Bande mit Maximum bei 338 nm ($\varepsilon = 4,9 \cdot 10^6$ cm^2/mol).

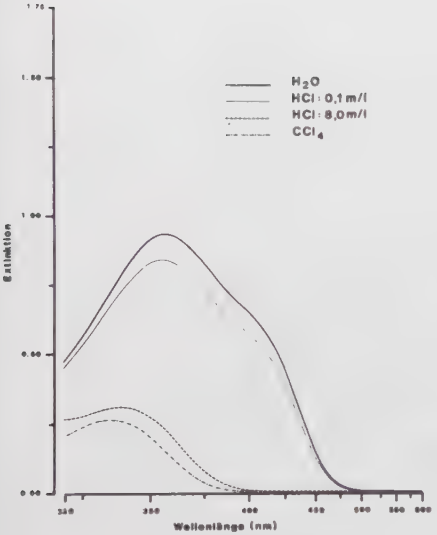


Abb. 6: Absorptionsspektrum von Pikrinsäure (0,625 mmol/l) in H_2O, HCl(0,1 mol/l; 8 mol/l) und CCl_4

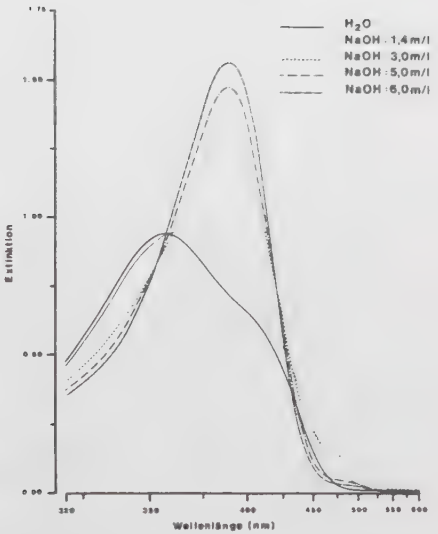


Abb. 7: Absorptionsspektrum von Pikrinsäure (0,625 mmol/l) in H_2O und NaOH (1,4 - 6 mol/l)

Die bathochrome Verschiebung des Absorptionsspektrums bei Übergang des Pikrinsäure-Moleküls in das Pikrat wird hauptsächlich durch sterische Effekte bedingt, die auf die Protonenabspaltung von der Hydroxyl-Gruppe zurückzuführen sind und zu einer Erhöhung der Elektronendichte im aromatischen System führen (282).

Der Verlauf des Pikrat-Spektrums im alkalischen Milieu ist von der OH^--Konzentration abhängig (Abb. 7). Bei Anstieg der NaOH-Konzentration bis ca. 1,5 mol/l tritt eine leicht bathochrome Verschiebung der Pikratbande und eine geringe Zunahme des Extinktionskoeffizienten auf. Ein weiterer Anstieg der NaOH-Konzentration ist mit einer Abnahme der Absorption bei 355 nm verbunden, unter gleichzeitiger Ausbildung einer neuen Bande mit Maximum bei 388 nm, welches seine Lage bei weiter ansteigender NaOH-Konzentration nicht mehr ändert. Es tritt dann lediglich noch eine Zunahme der Absorption im Bereich der neu entstandenen Bande auf.

Im Bereich zwischen 460 und 540 nm zeigt das Spektrum einer alkalischen Pikratlösung eine Schulter, wobei hier die Größe des Extinktionskoeffizienten sehr stark von der NaOH-Konzentration abhängig ist. Die Absorption im Bereich dieser Schulter nimmt bis zu einer gewissen NaOH-Konzentration zu, um dann bei einem weiteren OH^--Anstieg wieder abzunehmen.

Die Überprüfung des Temperatureinflusses auf das Pikratspektrum ergibt bei Temperaturanstieg eine bathochrome Verschiebung der Bande, verbunden mit einer geringen Extinktionszunahme. Ein Anstieg um $10^{\circ}C$ bedingt eine Verschiebung des Maximums um ca. 3 nm. Diese temperaturabhängige Veränderung des Absorptionsspektrums ist auf die Beeinflussung der Solvatisierung zurückzuführen.

Die bei NaOH-Zugabe auftretende Veränderung des Pikratspektrums ist, unabhängig von der NaOH-Konzentration, durch Neutralisation voll reversibel.

3.2.3.2. Extinktionsänderung bei konstanter Wellenlänge (485 nm; 388 nm)

Um weitere Hinweise auf den Reaktionsablauf bei der Anlagerung von Hydroxyl-Ionen an Pikrat zu erhalten, wurden differenzierte Untersuchungen der OH^--abhängigen Absorptionsänderung bei 485 nm (d. h. im Bereich der Schulter) sowie bei 388 nm (d.h. im Bereich der sich allmählich ausbildenden Bande) durchgeführt (Abb. 8; Abb. 9).

a) Bei 485 nm fand sich für eine 1,5 mmol/l Pikratlösung zwischen der Zunahme der Absorption (y) und der Zunahme der NaOH-Konzentration (x) im Konzentrationsbereich von 0 - 210 mmol/l NaOH eine direkte lineare Beziehung ($y = 0,0214\ x + 0,02$; $r \geq 0,999$). Ein Anstieg der OH^--Konzentration über 210 mmol/l führt zu einer Zunahme von $dE/d[OH]$. Im Bereich von 1,3 mol/l bis 2,4 mol/l NaOH ist die Extinktionsänderung erneut der Änderung der Basenkonzentration direkt proportional ($y = 0,142\ x - 0,009$; $r \geq 0,999$). Bei 2,6 mol/l NaOH erreicht die Extinktion in diesem Wellenlängenbereich ein Maximum. Ein weiterer Anstieg der NaOH-Konzentration hat wieder eine Abnahme der Absorption zur Folge.

Von 2,8 bis 3,8 mol/l wurde zwischen der Abnahme der Extinktion(y) und der Zunahme der NaOH-Konzentration(x) folgende lineare Beziehung gefunden: $y = -0,092x + 0,498$; $r \geq 0,999$.

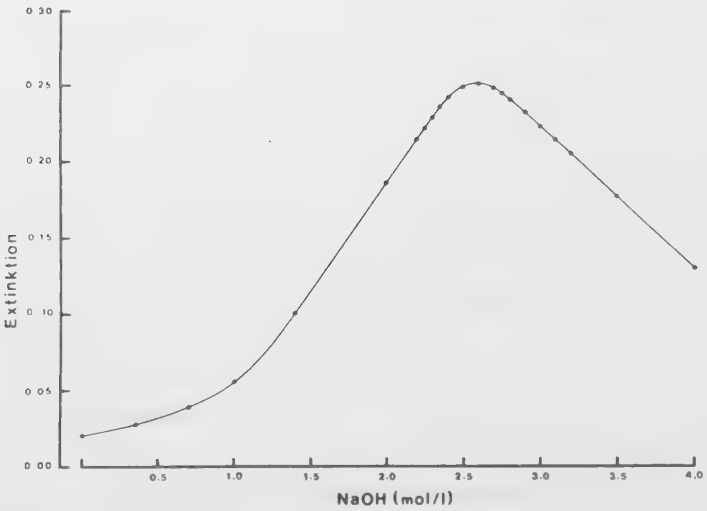


Abb. 8: Einfluß der NaOH-Konzentration auf die Absorption einer 1,5 mmol/l Pikratlösung bei 485 nm

Eine Änderung der Pikrat-Konzentration bedingt eine leichte Verschiebung dieser Werte, wie Untersuchungen einer 7,5 mmol/l Pikratlösung zeigten. Insgesamt fand sich jedoch ein ähnlicher Verlauf der von der OH^--Konzentration abhängigen Extinktionsänderung. Die lineare Beziehung zwischen der Extinktionszunahme und dem Anstieg der Basenkonzentration tritt erst im Bereich zwischen 1,7 und 2,6 mol/l NaOH auf. Das Extinktionsmaximum im langwelligen Bereich (485 nm) wird bei 2,8 mol/l NaOH erreicht.

b) Der Einfluß der OH^--Konzentration auf die Extinktion bei 388 nm wurde an einer 0,625 mmol/l Pikratlösung untersucht. - In diesem Wellenlängenbereich überschreitet die Absorption einer 1,5 mmol/l Pikratlösung bei Ansteigen der NaOH-Konzentration über 3,5 mol/l auch bei einer Schichtdicke von 1 mm den Anzeigebereich (Extinktion: 2.0)des Gerätes. - Bei

388 nm findet sich bis zu einer NaOH-Konzentration von 2,4 mol/l eine geringe Extinktionszunahme. Eine weitere Erhöhung der Basenkonzentration führt schließlich zu einem steileren Anstieg der Absorption, wobei im NaOH-Konzentrationsbereich von 2,8 mol/l bis 4 mol/l eine lineare Beziehung zwischen der Extinktionsänderung und der Änderung der Basenkonzentration besteht ($y = 0,3123\ x - 0,0038$; $r = 0,999$).

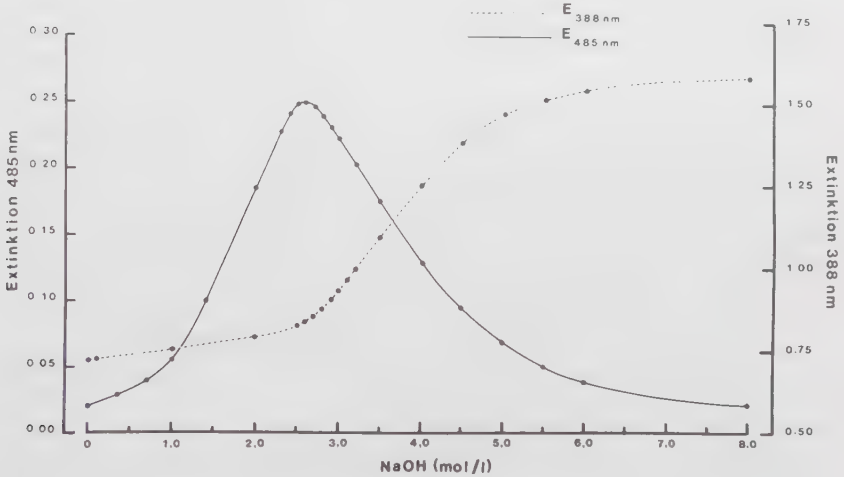


Abb. 9: Einfluß der NaOH-Konzentration auf

a) Absorption einer 1,5 mmol/l Pikratlösung bei 485 nm
b) Absorption einer 0,625 mmol/l Pikratlösung bei 388 nm

3.2.3.3. Quantitative Erfassung der absorbierenden Komponenten

Um die Anzahl der im Wellenlängenbereich 330 - 550 nm lichtabsorbierenden Komponenten des Systems NaOH-HPi zu bestimmen, wurden die Spektren einer 0,625 mmol/l Pikrinsäure in

Natronlauge des Konzentrationsbereiches 0,8 und 4,6 mol/l bei 20 Wellenlängen vermessen. Die Rangbestimmung der Matrix der optischen Dichten (20 x 6) ergab den Rang 3. - Die Rangbestimmung erfolgte über ein IBM-Programm (MFGR) auf einer IBM 1800. - Dies bedeutet, daß in dem o.g. OH^--Konzentrationsbereich mindestens 3 verschieden absorbierende Komponenten vorhanden sein müssen.

3.2.4. Die Anlagerung von OH^- an Pikrat

Bei der Reaktion von Pikrat mit OH^- kann es aufgrund der Untersuchungen von CRAMPTON (81, 82, 103) als gesichert gelten, daß

1. es zu einer nucleophilen Addition von OH^- an das Pikrat kommt;
2. eine rasche Ionisation der angelagerten Hydroxyl-Gruppe erfolgen kann;
3. eine Diadduktbildung mit Anlagerung der Hydroxyl-Ionen an beiden unsubstituierten Ring-C-Atomen des Pikrates auftreten kann.

Die C-Atome des Pikrates, die Nitrogruppen tragen, scheiden für die Basenanlagerung aus, da sie durch die Nitrogruppe jeweils sehr stark abgeschirmt sind und zu erwarten ist, daß die hierbei entstehenden Molekülkomplexe nur eine sehr geringe Stabilität besitzen (79). Somit kommen für die Basenanlagerung an Pikrat das substituierte C-Atom (C-1) sowie die beiden unsubstituierten Ring-C-Atome in Frage, wobei sich folgende Überlegungen ergeben:

a) Anlagerung an C-1:

Die Bildung von C_1-Addukten ist stets dann thermodynamisch begünstigt, wenn die Basenanlagerung eine starke Verminderung der Ringspannung im Grundzustand des Reaktions-

produktes bewirkt (59, 80, 287, 302).
Weitere Gründe für die größere Stabilität der C_1-Addukte werden darin gesehen, daß 1.) die Möglichkeit einer Hyperkonjugation bei dem C_1-Atom besteht, da dies mit den beiden Substituenten und den Ring-C-Atomen C_2 und C_6 einen Tetraederwinkel bildet, 2.) die koplanare Anordnung der Nitrogruppen mit dem Benzolring bei Adduktbildung zunimmt, wodurch die Delokalisation der Ring-π-Elektronen verstärkt wird (80, 287, 302).

Der Wirkungsradius des Substituenten an C_1 des Nitroaromaten ist bei dem Pikratmolekül wesentlich kleiner als bei Methyl-Pikrat. Dadurch ist auch die Ringspannung bei Pikrat geringer. Aus diesem Grund ist zu erwarten, daß die Bildung des C_1-Adduktes bei der Reaktion von Pikrat mit OH^- nur eine vergleichsweise geringe Verminderung der Ringspannung zur Folge hat, wodurch die Bildung des C_3-Adduktes thermodynamisch wesentlich weniger begünstigt wird als bei der Reaktion von Methyl-Pikrat mit Methanolat.

b) Anlagerung an ein unsubstituiertes Ring-C-Atom
Die Basenanlagerung an einer unsubstituierten Position des Pikrates wird kinetisch begünstigt, da:

1. sterische Effekte für die Anlagerung an ein unsubstituiertes Ring-C-Atom unbedeutend sind (80);
2. zu erwarten ist, daß für Bildung des C_3-Adduktes eine geringere Aktivierungsenergie erforderlich ist, als für Bildung des C_1-Adduktes.

Allgemein läuft bei 1-substituierten 2,4,6-Trinitroaromaten die OH^--Anlagerung an dem unsubstituierten Ring-C-Atom je nach Substituent in C_1 ca. 9 bis 30mal rascher ab als die Anlagerung an C_1 (103).

3.2.5. Die Reaktionsprodukte

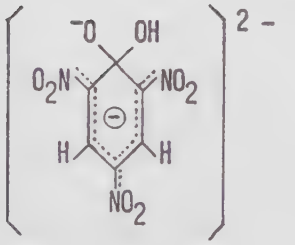
Die Differenzierung des Reaktionsablaufes und der Position der Basenanlagerung ist bevorzugt durch NMR-Untersuchungen möglich, jedoch können auch aus dem Verlauf des Absorptionsspektrums Aussagen über die Art des Reaktionsproduktes und den Ort der Basenanlagerung gemacht werden. Einschränkend ist hier jedoch festzustellen, daß die Absorptionsspektren der EDA-Komplexe und der anionischen σ-Komplexe häufig sehr ähnlich sind (22, 48, 287).

Untersuchungen zum Absorptionsspektrum der Addukte, die 1-substituierte 2,4,6-Trinitroaromate mit Basen bilden können (80, 287), ergaben:

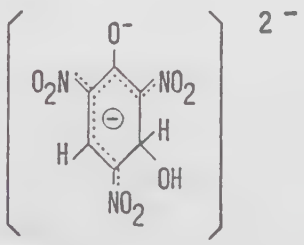
I. Die Monoaddukte zeigen im sichtbaren Bereich zwei Banden, bzw. eine Bande im kürzerwelligen und eine Schulter im längerwelligen Bereich. Der Extinktionskoeffizient des Maximums der kürzerwelligen Bande ist stets wesentlich größer als der Extinktionskoeffizient des Maximums der längerwelligen Bande (80, 287). Die Spektren der C_1- und C_3-Addukte ähneln sich sehr. Die Ionisation der angelagerten Hydroxyl-Gruppe führt zu einer leichten Verschiebung des Spektrums zum längerwelligen Bereich hin, verbunden mit einer Intensitätszunahme im Bereich der Schulter (103). Da das Trianion jedoch nur von den C_3-Addukten gebildet wird - die Ionisierung der OH^--Gruppe nach Anlagerung an C_1 hat eine Abspaltung des Substituenten von C_1 zur Folge (103) -, kann diese Veränderung des Spektrums als charakteristisch für die C_3-Addukte angesehen werden. Dadurch wird mit Hilfe des Absorptionsspektrums eine Aussage über die Position der Basenanlagerung möglich.

II. Das Spektrum der Diaddukte zeigt im sichtbaren Bereich nur eine Bande (Propenid-Bande). Eine Schulter im längerwelligen Abschnitt tritt nicht auf (287).

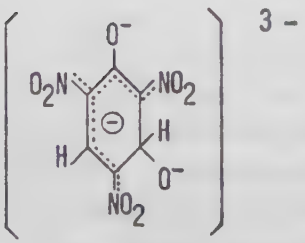
Bei Zuordnung der von uns gefundenen Spektren (Abb. 7) zu den verschiedenen Addukten ergibt sich, daß in einer wässrigen, alkalischen Pikratlösung neben Pikrat - je nach OH^--Konzentration - auch Monoaddukte und Diaddukte auftreten. Bei den Monoaddukten sind sowohl C_1- wie auch C_3-Addukte zu erwarten. Für die Molekülkomplexe ergeben sich die Strukturen I - IV.



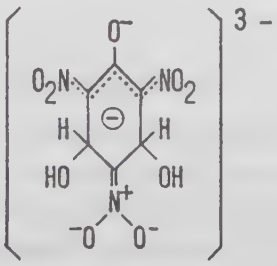
(I)
1-Hydroxy-Pikrat



(II)
3-Hydroxy-Pikrat
(Dianion)



(III)
3-Hydroxy-Pikrat
(Trianion)



(IV)
3,5-Dihydroxy-Pikrat

3.2.6. Der Reaktionsablauf

Berücksichtigt man die Beobachtung, daß der Extinktionskoeffizient im Bereich der Schulter bei den C_3-Addukten größer ist als bei den C_1-Addukten (s.o.), so weist der Verlauf der Absorptionsänderung einer alkalischen Pikratlösung bei 485 nm (Abb. 8; Abb. 9) darauf hin, daß bei niedriger Basenkonzentration zunächst die thermodynamisch begünstigten C_1-Addukte überwiegen und erst bei höherer Basenkonzentration der relative Anteil der weniger stabilen C_3-Addukte und deren Trianion zunimmt. In wässriger, alkalischer Pikratlösung sind folgende reversible Gleichgewichtsreaktionen zu erwarten:

1a) $Pi^- + OH^- \underset{-K1_{C3}}{\overset{K1_{C3}}{\rightleftharpoons}} (PiOH)^{2-}_{C3}$

1b) $(PiOH)^{2-}_{C3} + OH^- \underset{-K}{\overset{K}{\rightleftharpoons}} (PiO)^{3-}_{C3} + H_2O$

2) $Pi^- + OH^- \underset{-K1_{C1}}{\overset{K1_{C1}}{\rightleftharpoons}} (PiOH)^{2-}_{C1}$

3) $(PiOH)^{2-}_{C3} + OH^- \underset{-K2}{\overset{K2}{\rightleftharpoons}} (Pi(OH)_2)^{3-}_{C3/C5}$

Die weitgehend lineare Beziehung, die in drei verschiedenen NaOH-Konzentrationsbereichen zwischen Basenkonzentration und Gesamtabsorption bei 485 nm gefunden wurde (Abb. 8, Abb. 9), verdeutlicht die schrittweise Anlagerung von OH^- an das Pikrat. In dem Konzentrationsbereich von 0 bis 2,4 mol/l NaOH überwiegt die Monoadduktbildung, wobei zu erwarten ist, daß zunächst (0-0,21 mol/l NaOH) C_1-Addukte vorherrschen. Die stärkere Zunahme der

Absorptionsänderung im Bereich über 1,3 mol/l NaOH deutet auf die Zunahme der C_3-Addukte hin, die dann zum größten Teil als Trianion vorliegen. Die lineare Beziehung im Bereich von 2,3 - 3,8 mol/l NaOH charakterisiert schließlich den Übergang in die Diaddukte, der durch eine Abnahme der Absorption im längerwelligen Bereich gekennzeichnet ist, verbunden mit einer Absorptionszunahme bei 388 nm. Die Absoprtionsänderung ($dE/d[OH^-]$) stellt ein Maß für die jeweilige Bildungskonstante dar.

Aufgrund der spektralphotometrischen Untersuchungen ist folgender Ablauf für die Umsetzung von Pikrat mit OH^- in wässrigem Milieu anzunehmen: Initial erfolgt die kinetisch begünstigte Anlagerung von OH^- an einer unsubstituierten Position des Pikrates. Unter Ausbildung eines Tautomerie-Gleichgewichtes entstehen gleichzeitig C_1-Addukte. Analog der Anlagerung von Methanolat an Methyl-Pikrat liegt das Gleichgewicht weitgehend auf Seiten des C_1-Adduktes. Kennzeichnend für die rasche Einstellung des Tautomerie-Gleichgewichtes ist das kurzzeitige Auftreten der von den C_3-Addukten herrührenden Braunfärbung, die nur unmittelbar nach Zugabe von NaOH zu Pikrat zu beobachten ist und sich bereits 5 Sekunden danach wieder zurückgebildet hat.

Bei höherer OH^--Konzentration wird der relative Anteil der C_3-Addukte größer. Sie liegen dann überwiegend als Trianion vor. Gleichzeitig nimmt die Diaddukt-Bildung mit steigender Basenkonzentration zu und steht bei Konzentrationen über 2,8 mol/l NaOH im Vordergrund.

Zur weiteren Abklärung, welcher Reaktionspartner bei der Jaffé-Reaktion für das Kreatininat-Ion in Frage kommt, ist die Kenntnis der Gleichgewichtskonstanten K_i für die Anlagerung von OH^- an Pikrat Voraussetzung. Werden hierzu gemäß Modellvorstellung

einer sukzessiven Anlagerung von OH^- an das Pikrat-Ion die Gleichgewichtsbedingungen für Mono- und Dihydroxy-Pikrat mathematisch formuliert

1-Hydroxy-Pikrat; 3-Hydroxy-Pikrat $\left[(PiOH)^{2-}\right]$:

$$(PiOH)^{2-} = Pi^- \cdot OH^- \cdot K1 \cdot f_{OH^-} \cdot f_{Pi^-} / f_{(PiOH)^{2-}}$$

3,5-Dihydroxy-Pikrat $\left[(Pi(OH)_2)^{3-}\right]$:

$$(Pi(OH)_2)^{3-} = Pi^- \cdot OH^{-2} \cdot K1 \cdot K2 \; f^2_{OH^-} \cdot f_{Pi^-} / f_{(Pi(OH_2)^{3-}}$$

und mit der gemessenen Extinktion über die individuellen Aktivitätskoeffizienten verknüpft, so resultiert die Gleichung:

$$\frac{D}{Pi_o} = \frac{\varepsilon_{Pi^-} + \varepsilon_{Pi(OH)^{2-}} \cdot K1 \cdot a_{OH^-} \cdot f_{Pi^-} / f_{Pi^-OH^{2-}} + \varepsilon_{(Pi(OH)_2)^{3-}} \cdot}{1 + K1 \cdot a_{OH^-} \cdot f_{Pi^-} / f_{Pi(OH)^{2-}} + K1 \cdot K2 \cdot a^2_{OH^-} \cdot}$$

$$\frac{\cdot K1 \cdot K2 \cdot a^2_{OH^-} \cdot f_{Pi^-} / f_{(Pi(OH)_2)^{3-}}}{\cdot f_{Pi^-} / f_{(Pi(OH)_2)^{3-}}}$$

Pi_o = Pikratgesamtkonz. (mol/l)

Pi^-, OH^- = Konz. der betreffenden Ionen

K_i = Gleichgewichtskonstante für die Anlagerung

f = Aktivitätskoeffizient, berechnet nach Debye-Hückel

D = optische Dichte

ε = Extinktionskoeffizient (cm^2/mol)

a_{OH^-} = Aktivität der OH^--Ionen

Für die Berechnung der Aktivitätskoeffizienten wurde die erweiterte Debye-Hückel-Onsager Gleichung mit einem wirksamen Ionenradius von 7,1 Å herangezogen. Die Bestimmung der Parameter erfolgte mit einer Labor-Routine der HNO-Klinik - SPEK3 - auf einer IBM 1800. Hierzu wurden die durch Variation der NaOH-Konzentration des Milieus bei 388 nm und 485 nm gefundenen Werte für die Extinktionsänderung einer alkalischen Pikratlösung - jeweils 34 Messungen (s. Abb. 8; Abb. 9) - verwendet. Bei 388 nm und 485 nm wurden auf diese Weise folgende Gleichgewichtskonstanten für die Monoaddukt- und Diadduktbildung erhalten:

$K1 = 0,08\ mol^{-1}l$; $K2 = 0,0025\ mol^{-1}l$

Der für K1 gefundene Wert beschreibt sowohl die Bildungskonstante von 1-Hydroxy- als auch von 3-Hydroxy-Pikrat. Eine Differenzierung zwischen den Bildungskonstanten der C_1- und C_3-Addukte war nicht möglich. Wie bereits ausgeführt, ist jedoch zu erwarten, daß $K1_{C_1} > K1_{C_3}$ ist.

Bei der Berechnung der Extinktionskoeffizienten war ebenfalls keine Unterscheidung zwischen den Werten für die C_1- und C_3-Addukte möglich. Für die individuellen Extinktionskoeffizienten von Pikrat, Mono- und Dihydroxy-Pikrat bei 388 und 485 nm und einer Meßtemperatur von 35°C wurden folgende Werte bestimmt:

388 nm:	485 nm:
$\varepsilon_{Pi^-} = 1,17\ \ 10^7\ cm^2mol^{-1}$	$\varepsilon_{Pi^-} = 1,133 \cdot 10^5\ cm^2\ mol^{-1}$
$\varepsilon_{Pi^-(OH)_2^{2-}} = 1,108 \cdot 10^7\ cm^2mol^{-1}$	$\varepsilon_{Pi^-(OH)_2^{2-}} = 2,76 \cdot 10^6\ cm^2mol^{-1}$
$\varepsilon_{Pi^-(OH)_2^{3-}} = 2,53 \cdot 10^7\ cm^2mol^{-1}$	$\varepsilon_{Pi^-(OH)_2^{3-}} = 1,13 \cdot 10^5\ cm^2mol^{-1}$

Bei der Berechnung des prozentualen Anteils der verschiedenen Pikrinsäurederivate in den einzelnen NaOH-Konzentrationsbereichen war eine Differenzierung zwischen dem Anteil der C_1- und C_3-Addukte ebenfalls nicht möglich. Die Verteilung ist in Abb. 10 dargestellt.

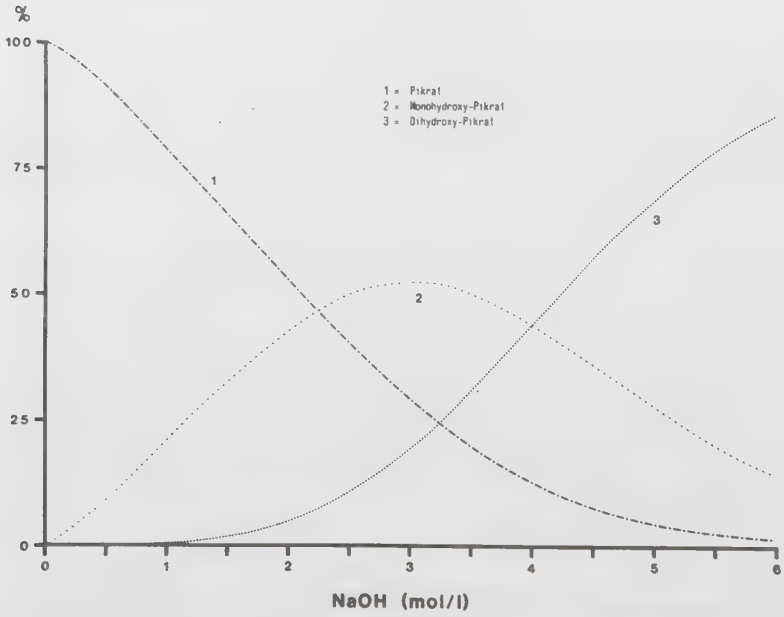


Abb. 10: Die prozentuale Verteilung von Pikrat, Monohydroxy-Pikrat und 3,5-Dihydroxy-Pikrat in Abhängigkeit von der NaOH-Konzentration. (Zur Bestimmung wurden die durch Variation der NaOH-Konzentration des Milieus erhaltenen Werte für die Extinktionsänderung bei 485 nm einer 1,5 mmol/l Pikratlösung herangezogen)

In dem für die Jaffé-Reaktion bedeutsamen OH^--Konzentrationsbereich von 0,05 - 0,2 mol/l (s. Kap. 5.3.1.3.) liegen die Pikrinsäurederivate in folgendem Verhältnis zueinander vor:

NaOH (mol/l)	Pi^-	$Pi(OH)^{2-}$	$Pi(OH)_2^{3-}$
0,1	98,59 %	1,4 %	0,001 %
0,15	97,75 %	2,24 %	0,003 %
0,2	96,84 %	3,14 %	0,006 %

3.2.7. Mögliche Reaktionspartner des Kreatinins bei Jaffé-Reaktion

3,5-Dihydroxy-Pikrat kommt sowohl aufgrund seiner geringen Tendenz zur Weiterreaktion als auch aufgrund seiner niedrigen Konzentration für die Bildung des Jaffé-Adduktes nicht in Frage. Bei den Monoaddukten erweist sich 3-Hydroxy-Pikrat aus sterischen Gründen sowie aufgrund der Ionisierung der angelagerten Hydroxylgruppe für die Anlagerung von Kreatininat als ungünstig. Bei der Anlagerung von Kreatinin an das unsubstituierte Ring-C-Atom des C_3-Adduktes entstehen stabile Diaddukte. Während Pikrat aufgrund seiner, im Bereich von 0,05 bis 0,2 mol/l NaOH, etwa 40- bis 70fach höheren Konzentration als Reaktionspartner in Frage kommen kann, ist 1-Hydroxy-Pikrat, trotz des prozentual geringeren Anteils im Reaktionsansatz, aufgrund der vergleichsweise stärkeren Positivierung der unsubstituierten Positionen als Reaktionspartner des Kreatinins zu diskutieren, wobei eine Additions-Eliminations-Reaktion zu erwarten wäre.

4. REAKTIONSPRODUKT UND REAKTIONSMECHANISMUS DER JAFFÉ-REAKTION

Über den Reaktionsmechanismus und die Struktur des Reaktionsproduktes der Jaffé-Reaktion liegt eine Vielzahl von Untersuchungen vor. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse und Schlußfolgerungen hinsichtlich Struktur und Zusammensetzung des Reaktionsproduktes sowie die verschiedenen Theorien zum Reaktionsmechanismus sind in Tab. II in chronologischer Reihenfolge zusammengefaßt.

4.1. DAS REAKTIONSPRODUKT DER JAFFÉ-REAKTION

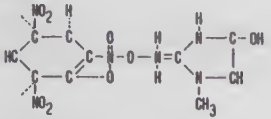
Für Untersuchungen am isolierten Reaktionsprodukt der Jaffé-Reaktion - von uns als "Jaffé-Addukt" bezeichnet - wurde der Molekülkomplex vorwiegend nach ANSLOW & KING (7) durch Ausfällung des Reaktionsproduktes aus einem wässrigen Reaktionsansatz mit konz. HCl dargestellt. Da jedoch die Zugabe von HCl in diesem, durch ein Netzwerk von Gleichgewichtsbedingungen bestimmten System selbst dann, wenn die Kinetik langsam verläuft, maßgebliche Veränderungen erwarten läßt, sind aus der auf diese Weise isolierten Verbindung nur bedingt Rückschlüsse auf die Struktur des primär entstehenden Molekülkomplexes möglich.

Die angestrebte Isolation des Jaffé-Adduktes aus einer wässrigen Lösung des Reaktionsansatzes gelang trotz hoher Konzentration der Reaktionspartner nicht. Ausgehend von der bei Voruntersuchungen gemachten Beobachtung, daß das Reaktionsprodukt der Jaffé-Reaktion in methanolischer Lösung schwerer löslich ist, als in H_2O, wurde das Jaffé-Addukt für die hier durchzuführenden

1909 CHAPMAN:
DAS REAKTIONSPRODUKT DER JAFFÉ-REAKTION IST PIKRAMINSÄURE

1924 GREENWALD & GROSS:
ISOLIERUNG EINES ROTEN MOLEKÜLKOMPLEXES DURCH FÄLLUNG MIT KONZ. HCL. ANNAHME, DASS DAS REAKTIONSPRODUKT EIN ADDUKT AUS PIKRAT UND KREATININ IST.

1925 GREENWALD:
KETO-ENOL-TAUTOMERIE DES KREATININS IM ALKALISCHEN MILIEU. REAKTIONSPRODUKT DER JAFFE-REAKTION IST DIE ENOLFORM DES GELBEN KREATININ-PIKRATES. STRUKTURVORSCHLAG FÜR DAS ROTE KREATININ-PIKRAT:



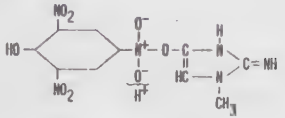
1925: GREENWALD:
ANNAHME, DASS ALLE DREI NITROGRUPPEN DER PIKRINSÄURE AN DER REAKTION BETEILIGT SIND.

1928 GREENWALD:
AUSFÄLLUNG EINES DIKREATININ-PIKRAT-KOMPLEXES MIT ÄTHANOL AUS EINEM WÄSSRIGEN REAKTIONSANSATZ. ZUSAMMENSETZUNG : 2 MOL KREATININ + 1 MOL HPI + 3 MOL NAOH + 3 MOL H_2O

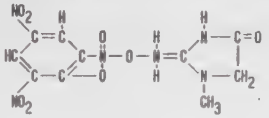
1928 GREENWALD:
ISOLATION EINES MONOKREATININ-PIKRAT-KOMPLEXES DURCH FÄLLUNG MIT ÄTHANOL. ZUSAMMENSETZUNG: 1 MOL KREATININ + 1 MOL HPI + 2 MOL NAOH

1928 WEISE & TROPP:
DEUTUNG DER JAFFÉ-REAKTION ALS SPEZIALFALL EINER ALLGEMEINEN REAKTION VON VERBINDUNGEN MIT AKTIVEN METHYLEN- ODER METHINGRUPPEN MIT NITROSUBSTITUIERTEN BENZOLEN.

1929 ANSLOW & KING:
ISOLATION EINES ROTEN MOLEKÜLKOMPLEXES DURCH FÄLLUNG MIT KONZ. HCL.
ZUSAMMENSETZUNG: 1 MOL KREATININ + 1 MOL PIKRAT.
BEI DER JAFFE-REAKTION WIRD KREATININ DURCH NAOH IN DIE ENOLFORM ÜBERFÜHRT; ANLAGERUNG DES ENOLAT-ANIONS AN EINE NO_2-GRUPPE DES PIKRATES. STRUKTURVORSCHLAG FÜR DAS REAKTIONSPRODUKT:

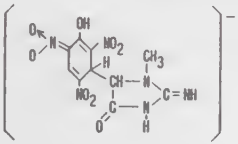


1930 GREENWALD:
DIE KETO-ENOL-TAUTOMERIE DES KREATININS IST FÜR DIE JAFFÉ-REAKTION VON ENTSCHEIDENDER BEDEUTUNG. KREATININ LAGERT SICH ALS ENOLAT-ANION AN PIKRAT AN. STRUKTURVORSCHLAG FÜR DAS GELBE KREATININ-PIKRAT:



1937 BOLLINGER:
ISOLATION EINES ROTEN MOLEKÜLKOMPLEXES DURCH FÄLLUNG MIT ÄTHANOL.
ZUSAMMENSETZUNG: 1 MOL KREATININ + 1 MOL HPI + 2 MOL NAOH.
ANNAHME, DASS SICH DAS KREATININ-ENOL AN PIKRAT ANLAGERT.

1955 KIMURA:
DAS PRIMÄRE REAKTIONSPRODUKT DER JAFFÉ-REAKTION IST DAS ZWISCHENPRODUKT EINER NUKLEOPHILEN AROMATISCHEN SUBSTITUTION UND ENTSTEHT DURCH NUKLEOPHILE ADDITION EINES KREATININ-CARBANIONS AN EIN C-ATOM DES PIKRATES. STRUKTURVORSCHLAG:



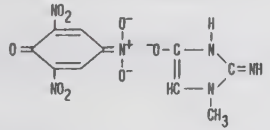
Fortsetzung S. 64

1950 VAN PILSUM ET AL.:
NACHWEIS VON PIKRAMINSÄURE UND METHYLGUANIDIN IM JAFFÉ-REAKTIONSANSATZ BEI LÄNGERER REAKTIONSZEIT BZW. HÖHERER REAKTIONSTEMPERATUR (30 - 50°C). ANNAHME, DASS DIE TYPISCHE ABSORPTION DER JAFFE-REAKTION DURCH PIKRAMINSÄURE BEDINGT WIRD.

1962 ARCHIBALD:
BEI DER JAFFÉ-REAKTION ERFOLGT INITIAL DIE BILDUNG DES ROTEN TAUTOMEREN DES GELBEN KREATININ-PIKRATES. BEI DER WEITERREAKTION BILDUNG VON METHYLGUANIDIN UND EINES REDUKTIONSPRODUKTES VON PIKRAT, MÖGLICHERWEISE PIKRAMAT.

1969 SEELIG:
NAOH-ZUGABE FÜHRT ZUR BILDUNG DES KREATININ-ENOLS. NACH PROTONENABSPALTUNG ERFOLGT DIE ADDITION DER KONJUGIERTEN BASE DES KREATININ-ENOLS AN DAS N-ATOM DER PARA-NITROGRUPPE DER PIKRINSÄURE.

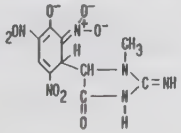
1969 SEELIG & WÜST:
STRUKTURVORSCHLAG FÜR DAS REAKTIONSPRODUKT:



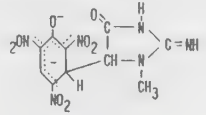
1969 BARTELS & CIKES:
DAS REAKTIONSPRODUKT DER JAFFE-REAKTION IST EIN "CHARGE-TRANSFERKOMPLEX". KREATININ IST DER ELEKTRONEN-DONATOR UND PIKRINSÄURE DER ELEKTRONEN-AKZEPTOR.

1974 BLASS & THIBERT:
POLAROGRAPHISCHER NACHWEIS, DASS DIE ZUGABE VON KREATININ ZU EINER WÄSSRIGEN LÖSUNG VON ALKALI-PIKRAT INITIAL ZUR BILDUNG EINES NITRO-ANIONS (ORTHO-NITROGRUPPE) FÜHRT.

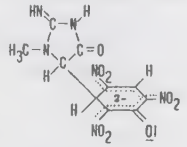
1974 BLASS & THIBERT:
ANLAGERUNG DES METHYLEN-ANIONS DES KREATININS AN EIN META-C-ATOM DES PIKRATES UNTER AUSBILDUNG EINES NITRO-ANIONS. BEI DER ANSCHLIESSENDEN WEITERREAKTION KOMMT ES ZUR UMWANDLUNG DER LABILEN BINDUNG ZWISCHEN KREATININ UND PIKRAT IN EINE STABILE BINDUNG. STRUKTURVORSCHLAG:



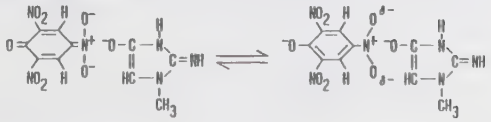
1975 BUTLER:
ABSPALTUNG EINES PROTONS VON DER METHYLENGRUPPE DES KREATININS DURCH NAOH-ZUGABE; ANLAGERUNG DES KREATININ-CARBANIONS AN PIKRAT UNTER AUSBILDUNG EINES JANOVSKY-KOMPLEXES. STRUKTURVORSCHLAG:



1976 ELLINGER, SEIDEL & KOVAR:
ES ENTSTEHT ZUERST KREATININ-PIKRAT, WELCHES SICH IM ALKALISCHEN MILIEU LANGSAM IN EINEN ANIONISCHEN σ-KOMPLEX UMLAGERT. HIERBEI ERFOLGT PROTONEN-ABSPALTUNG VON DER METHYLENGRUPPE DES KREATININS UND ANLAGERUNG DES KREATININ-CARBANIONS AN EIN META-C-ATOM DES PIKRATES UNTER BILDUNG EINES MEISENHEIMER-KOMPLEXES. STRUKTURVORSCHLAG:



1976 VASILIADES:
DIE JAFFE-REAKTION IST EINE MEHRSTUFIGE REAKTION. REAKTIONSSCHRITTE: UMLAGERUNG DES KREATININS IN DIE ENOLFORM UND MÖGLICHERWEISE BILDUNG EINER REAKTIVEN VORSTUFE DES PIKRATES; ABSPALTUNG EINES PROTONS VON DER ENOLGRUPPE DES KREATININS; IONENPAAR-BILDUNG DURCH ANLAGERUNG DES ENOLAT-ANIONS AN DAS N-ATOM DER PARA-NITROGRUPPE DES PIKRATES.
STRUKTURVORSCHLAG:



1979 KOHASHI ET AL.:
ISOLIERUNG DES REAKTIONSPRODUKTES AUS EINEM WÄSSRIGEN REAKTIONSANSATZ DURCH FÄLLUNG MIT METHANOL. PRIMÄRES REAKTIONSPRODUKT DER JAFFÉ-REAKTION IST EIN ANIONISCHER σ-KOMPLEX, DER DURCH ANLAGERUNG VON KREATININAT AN PIKRAT (C-3) GEBILDET WIRD. BEI DER WEITERREAKTION KOMMT ES ZUR DIADDUKTBILDUNG.

Tab. II: Chronologie der Vorschläge zum Reaktionsmechanismus der Jaffé-Reaktion und zur Struktur des Reaktionsproduktes

Untersuchungen aus methanolischer Lösung gefällt. Vergleichende spektralphotometrische Untersuchungen der Jaffé-Reaktion hatten in Methanol einen ähnlichen Verlauf der Reaktionskinetik gezeigt, wie in H_2O.

4.1.1. Versuchsdurchführung

4.1.1.1. Darstellung des Jaffé-Adduktes

Reaktionsansatz: 150 ml methanol. Pikratlösung (363,72 mmol/l) + 150 ml methanol. NaOH (1,5 mol/l) + 750 ml methanol. Kreatininlösung (70,72 mmol/l). (Methanol p.A.; max. 0,05 % H_2O;).

Zur Einschränkung einer evtl. Weiterreaktion wird die Jaffé-Reaktion bei $0^{\circ}C$ durchgeführt. Die Temperatur der Ausgangslösungen beträgt $4^{\circ}C$. Die Konzentrationen der Reaktionspartner sind so gewählt, daß sie im Reaktionsansatz nicht ausfallen.
Um die primäre Bildung von Kreatinin-Pikrat zu vermeiden, werden zuerst die methanolischen Lösungen von Pikrat und NaOH zusammengegeben. Anschließend wird Kreatinin zugesetzt und der Reaktionsansatz ca. 15 Min. bei $0^{\circ}C$ gut durchmischt. Danach wird der ausgefallene rote Niederschlag in der Kühlzentrifuge bei $0^{\circ}C$ abzentrifugiert. Zur Entfernung des überschüssigen Pikrates wird das ausgefällte Jaffé-Addukt nach Dekantieren des Überstandes zuerst mehrfach mit gekühltem Methanol ($0^{\circ}C$) und anschließend mit Diäthyläther (getrocknet; max. 0,01 % H_2O; Merck 929) extrahiert und jeweils in der Kühlzentrifuge ($0^{\circ}C$) abzentrifugiert.

Die Trocknung des Niederschlags erfolgt im Vakuum bei 10^{-2} Torr.

Da das aus methanolischer Lösung isolierte Jaffé-Addukt sehr hygroskopisch ist, wird der Molekülkomplex unter N_2 bei -20°C aufbewahrt.

Für vergleichende Untersuchungen wurde das Jaffé-Addukt nach dem von ANSLOW & KING (7) beschriebenen Verfahren durch Fällung mit konz. HCl dargestellt. Reinigung, Trocknung und Aufbewahrung des Molekülkomplexes erfolgte wie oben beschrieben.

In den folgenden Abschnitten wird das mit HCl gefällte Reaktionsprodukt der Jaffé-Reaktion als JA (HCl) und der aus methanol. Lösung ausgefallene Molekülkomplex als JA (MeOH) bezeichnet.

4.1.1.2. Zusammensetzung des Jaffé-Adduktes

Ausgangslösungen: 40 mg JA (MeOH) bzw. JA(HCl) werden jeweils in 40 ml H_2O gelöst = Lösung A (JA(MeOH)) bzw. Lösung A'. Zur Zerstörung des Jaffé-Adduktes werden 20 ml Lösung A (A') mit 30 ml HCl (0,01 n) versetzt. 60 Minuten nach HCl-Zugabe wird mit 0,01 n NaOH neutralisiert und mit H_2O bis zu einem Endvolumen von 100 ml aufgefüllt = Lösung B (Ja(MeOH)) bzw. Lösung B' (Ja(HCl)).

a) Pikrat-Bestimmung:
Zur Ermittlung des Pikrat-Anteils wird die Extinktion von Lösung B bzw. B' bei 485 nm gemessen.

b) Kreatinin-Bestimmung:
Messansatz: Probe: 0,2 ml Lösung B (B') + 2 ml HPi (7,2 mmol/l) + 1 ml NaOH (0,35 mol/l)
Referenzlösung: 0,2 ml HPi (Konz. wie in a) ermittelt) + 2 ml HPi

(7,2 mmol/l) + 1 ml NaOH (0,35 mol/l)
Wellenlänge: 485 nm; T = 35°C; Schichtdicke: 10 mm

c) Natrium-Bestimmung:
Die Na^+-Bestimmung erfolgte mittels Flammenphotometer (Beckmann DU).

4.1.1.3. Spektralphotometrie

Die Aufzeichnung der Absorptionsspektren der Molekülkomplexe erfolgte im Wellenlängenbereich zwischen 320 nm bis 600 nm; als Referenzlösung wurde das jeweilige Lösungsmittel verwendet; Schichtdicke: 1 mm.

4.1.2. Chemische Charakterisierung des Jaffé-Adduktes

JA(MeOH) und JA(HCl) sind amorphe Verbindungen mit karminroter Farbe, wobei JA(HCl) etwas dunkler erscheint.

a) Zusammensetzung:
Aufgrund der Bestimmung der Kreatinin-, Pikrat- und Natriumkonzentration ergibt sich für JA(MeOH) und JA(HCl) folgende Zusammensetzung:
JA(MeOH): 1Mol Kreatinin + 1 Mol Pikrat + 2 Mol Na^+
JA(HCl): 1Mol Kreatinin + 1 Mol Pikrat

Wird das hier gefundene Molverhältnis zugrundegelegt, so ergibt sich unter Berücksichtigung der Annahme, daß sich Kreatinin als Carbanion an Pikrat anlagert (s. Kap. 4.2.2.) zwischen dem für den Molekülkomplex berechneten Gewicht und dem in der Ausgangslösung (Lösung A) eingewogenen Gewicht eine Differenz, die bei JA(MeOH) einem H_2O-Anteil

von 3 Mol entspricht. Bei JA(HCl) entspricht das eingewogene Gewicht ungefähr dem berechneten Gewicht. Für JA-(MeOH) ergibt sich unter der Annahme einer Anlagerung von 3 Mol H_2O folgende Summenformel: $Na_2C_{10}H_8N_6O_8 \times 3\ H_2O$, woraus ein Molgewicht von 440,239 resultiert.

^{1}H-NMR-Untersuchungen von JA(MeOH) in DMSO-d_6 erlaubten keine Rückschlüsse auf die Struktur des Molekülkomplexes, da durch den Zerfall des Jaffé-Adduktes eine Überlagerung der Resonanzsignale des Molekülkomplexes mit den Signalen der Zerfallsprodukte Kreatinin und Pikrat auftrat, so daß eine Zuordnung der Resonanzsignale zu den verschiedenen Verbindungen nicht möglich war. (- Die ^{1}H-NMR-Untersuchungen wurden mit einem Bruker-WP-80-FT-NMR-Spektrometer (80 MHz) durchgeführt -).

b) Löslichkeit:

JA(MeOH): gut löslich in H_2O, DMSO, N,N-Dimethylformamid, Pyridin, Aethylenglykol; weniger gut löslich in Methanol, Aethanol; unlöslich in Diäthyläther, CCl_4, Acetonitril, n-Butanol, Sulfolan

JA(HCl): gut löslich in DMSO, N,N-Dimethylformamid, Pyridin, Äthylenglykol sowie in schwach alkalischer wässriger Lösung (0,05 n NaOH); unlöslich in H_2O, Methanol, Äthanol, n-Butanol, Diäthyläther, CCl_4 und Acetonitril

c) pH:

JA(MeOH): Der pH einer 1 mmol/l wässrigen Lösung von JA(MeOH) beträgt unmittelbar nach Lösen 9,3. Der sofort in Lösung einsetzende Zerfall von JA(MeOH) ist mit einem pH-Anstieg verbunden, wobei der pH 2 Stunden nach Lösen bereits 10,7 beträgt.

JA(HCl): Keine pH-Bestimmung möglich, da JA(HCl) beim Lösen in H_2O sofort zerfällt. pH des Zerfallsproduktes von JA(HCl) (Ausgangskonzentration 1 mmol/l): 3,82.

4.1.3. Absorptionsspektrum von JA(MeOH) und JA-(HCl)

4.1.3.1. Verlauf in H_2O und DMSO

a) H_2O: Das Absorptionsspektrum von JA(MeOH) zeigt in wässriger Lösung (Abb. 11) einen ähnlichen Verlauf wie das Spektrum eines Reaktionsansatzes der Jaffé-Reaktion bei höherer Kreatininkonzentration. Im sichtbaren Bereich treten ebenfalls zwei Absorptionsbanden auf. Der molare Extinktionskoeffizient - zur Berechnung wurde das experimentell ermittelte Molekulargewicht des Jaffé-Adduktes von 440,23 zugrundegelegt - beträgt für das Absorptionsmaximum der

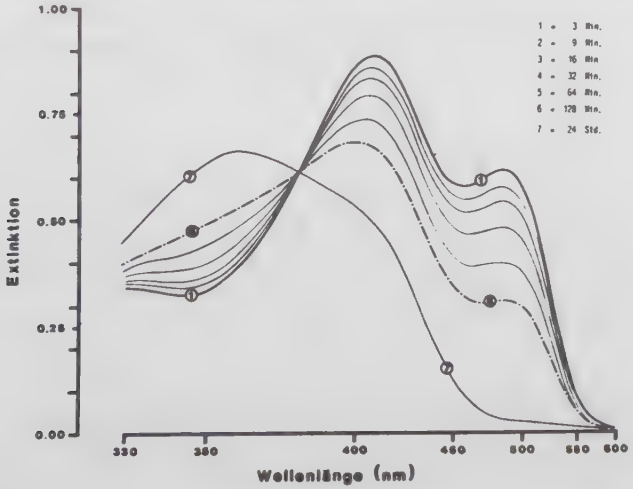


Abb. 11: a) Absorptionsspektrum von JA(MeOH) (0,465 mmol/l) in wässriger neutraler Lösung, verschiedene Zeiten nach Lösen in H_2O.
b) Absorptionsspektrum des Endproduktes (Spektrum 7) nach Zerfall von JA(MeOH) (0,465 mmol/l) in wässriger, neutraler Lösung (24 Stunden nach Lösen von JA-(MeOH) in H_2O).
Schichtdicke: 1 mm; T = 25°C.

Jaffé-Addukt	Lösungsmittel	Maximum der kürzerwelligen Bande λmax_1 (nm)	Maximum der längerwelligen "Jaffé-Bande" λmax_2 (nm)	Intensitätsverhältnis $(\varepsilon_1/\varepsilon_2)$
JA(MeOH)	Äthylenglykol (10°C)	406	492	1,304
	DMSO	407	517	1,179
	H_2O	407	484	1,384
	0,00001 mol/l HCl	407	485	1,461
	0,001 mol/l HCl	schwer löslich; geht unter Zerfall in Lösung		
	0,1 mol/l HCl			
	0,001 mol/l NaOH	408	484	1,350
	0,01 mol/l NaOH	408	484	1,357
	0,05 mol/l NaOH	408	484	1,413
	0,1 mol/l NaOH	408	484	1,491
	0,2 mol/l NaOH	405	484	1,646
	0,3 mol/l NaOH	400	484	1,982
	0,5 mol/l NaOH	396	Schulter von 470 - 486 nm	2,725 *
	0,6 mol/l NaOH	394		3,096 *
JA(HCl)	Äthylenglykol	gut löslich, sehr schneller Zerfall		
	DMSO	421	495	2,838
	H_2O	schwer löslich; geht unter Zerfall in Lösung		
	0,00001 mol/l HCl			
	0,001 mol/l HCl			
	0,1 mol/l HCl			
	0,001 mol/l NaOH	399	Schulter von 465 - 487 nm	2,309 *
	0,1 mol/l NaOH	398		2,474 *
	0,3 mol/l NaOH	393		4,237 *

* ε_2 wurde bei 485 nm bestimmt

Tab. III: Einfluß des Lösungsmittels auf Lage der Absorptionsmaxima und Verhältnis der molaren Extinktionskoeffizienten der beiden Banden des Jaffé-Adduktes (JA(MeOH), JA(HCl)).

kürzerwelligen Bande 1,89 · 10^7 cm mol^{-1} und für das Maximum der längerwelligen Bande 1,36 · 10^7 cm^2 mol^{-1}. Zur Lage der Absorptionsmaxima und zum Verhältnis der molaren Extinktionskoeffizienten s. Tab. III. JA(MeOH) ist in wässriger neutraler Lösung instabil. Die während des Zerfalls zu verschiedenen Zeiten nach Lösen des Molekülkomplexes aufgezeichneten Absorptionsbanden verlaufen bei 397 nm (25°C) durch einen isosbestischen Punkt (Abb. 11). Das Absorptionsspektrum des nach Abschluß des Zerfalls von JA(MeOH) in wässriger neutraler Lösung vorliegenden Endproduktes entspricht dem Spektrum von Kreatinin-Pikrat.
JA(HCl) geht in H_2O unter Zerfall in Lösung. Das Absorptionsspektrum des Zerfallsproduktes entspricht im sichtbaren Bereich ebenfalls dem Spektrum von Kreatinin-Pikrat. Nach dem Zerfall von JA(MeOH) und JA(HCl) in H_2O tritt bei NaOH-Zugabe wieder die Jaffé-Reaktion auf.

b) DMSO: (Abb. 12): Die Absorptionsspektren von JA(MeOH) und JA(HCl) verhalten sich in Dimethylsulfoxid (getrocknet; max. 0,01 % H_2O) im sichtbaren Bereich sowohl hinsichtlich der Lage der Banden als auch hinsichtlich des Verhältnisses zwischen den molaren Extinktionskoeffizienten der

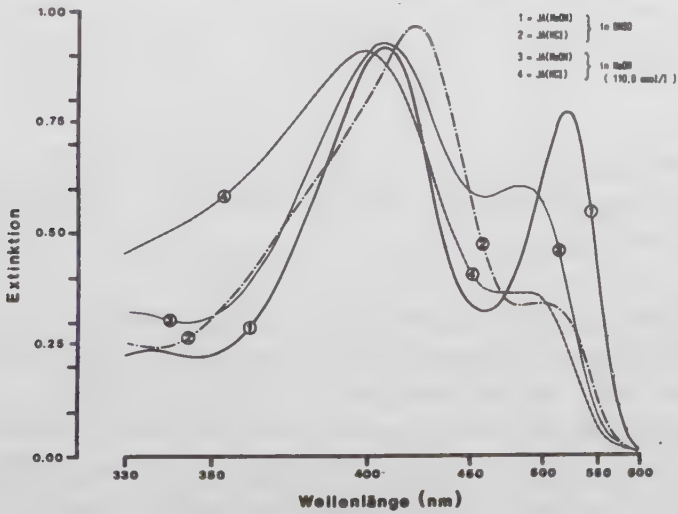


Abb. 12: Absorptionsspektrum des Jaffé-Adduktes in DMSO (JA(MeOH): 0,446 mmol/l; JA(HCl): 0,446 mmol/l) sowie in NaOH (109,37 mmol/l) (JA(MeOH): 0,465 mmol/l; JA(HCl): 0,465 mmol/l). Meßbeginn: jeweils 3 Min. nach Lösen des Jaffé-Adduktes; Schichtdicke: 1 mm; T = 25°C

Maxima der beiden Banden unterschiedlich.
Lage und Intensitätsverhältnis der Absorptionsmaxima s. Tab. III.
JA(MeOH) ist in DMSO stabiler als in wässriger neutraler Lösung, wobei die Zerfallsgeschwindigkeit in DMSO ca. 19,3 % geringer ist.
JA(HCl) zerfällt in DMSO ca. 17,5 % rascher, als JA(MeOH).

4.1.3.2. Temperaturabhängigkeit

Mit steigender Temperatur nimmt die Zerfallsgeschwindigkeit des Jaffe-Adduktes zu (genauere Angaben s. Kap.: 5.3.3.3.). Der Einfluß der Meßtemperatur auf die Lage des Absorptionsspektrums verhält sich bei dem Jaffe-Addukt ähnlich, wie bei Pikrat (s. Kap. 3.2.3.1.).

4.1.3.3. pH-Abhängigkeit

JA(MeOH): Mit zunehmender Acidität der Lösung nimmt die Zerfallsgeschwindigkeit von JA(MeOH) zu. In stark saurem Milieu (pH 1) geht der Molekülkomplex nur noch sehr langsam unter sofortigem Zerfall in Lösung.

Im alkalischen Milieu ist das Jaffe-Addukt relativ leicht löslich. Die Zerfallsgeschwindigkeit verhält sich zur Basenkonzentration umgekehrt proportional.

Steigende OH^--Konzentration führt zu einer leicht hypsochromen Verschiebung des Maximums der kürzerwelligen Bande, wogegen sich die Lage der längerwelligen Bande nicht ändert (Abb. 13). Die Extinktion der längerwelligen Bande nimmt mit steigender Basenkonzentration ab, wobei eine lineare Beziehung zwischen dem Extinktionskoeffizienten und der OH^--Konzentration besteht (s. Kap. 5.3.1.2.2.).

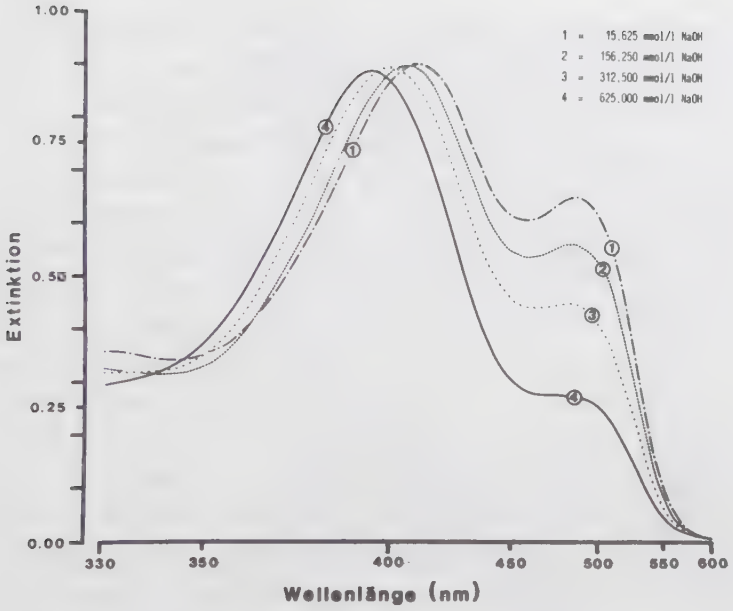


Abb. 13: Einfluß der OH^--Konzentration auf das Absorptionsspektrum des Jaffé-Adduktes (JA(MeOH): 0,465 mmol/l); NaOH: 15,625 mmol/l; 156,25 mmol/l; 312,5 mmol/l; 625,0 mmol/l;
Meßbeginn: jeweils 3 Min. nach Lösen des Jaffé-Adduktes in NaOH; Schichtdicke: 1 mm; T = 25 °C

JA(HCl): JA(HCl) ist in neutralem, wässrigem Medium unlöslich. In alkalischem Milieu zeigt es eine gute Löslichkeit, ist hier jedoch ebenfalls instabil. Bei jeweils gleicher OH^--Konzentration ist der Extinktionskoeffizient der längerwelligen "Jaffé-Bande" deutlich geringer als bei JA(MeOH) (Abb. 12). Dementsprechend ist hier das Verhältnis der molaren Extinktionskoeffizienten beider Banden je nach OH^--Konzentration auf 2,4 bis 2,6 : 1 angestiegen (s. Tab. III).

Der Einfluß der OH^--Konzentration auf Zerfallsgeschwindigkeit und Extinktionskoeffizienten der längerwelligen Bande ist dagegen ähnlich wie bei JA (MeOH).

Nach Lösen des Jaffé-Adduktes in NaOH tritt sowohl bei JA(MeOH) als auch bei JA(HCl) in Abhängigkeit von der NaOH-Konzentration mit zunehmender Reaktionszeit eine Abnahme der längerwelligen Bande und eine hypsochrome Verschiebung und Intensitätsabnahme der kürzerwelligen Bande auf. Die Absorptionsspektren der Endprodukte der Weiterreaktion bzw. des Zerfalls von JA(MeOH) und JA(HCl) in alkalischer Lösung sind identisch und zeigen im sichtbaren Bereich nur noch eine Bande mit Maximum bei 389 mm (Abb. 14).

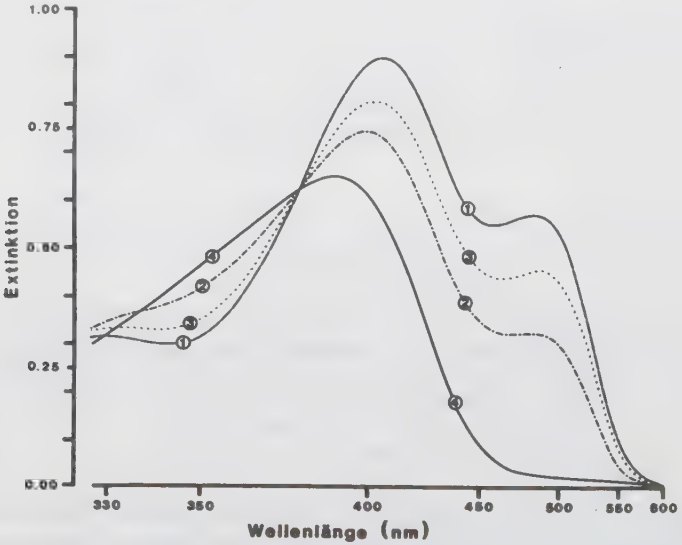


Abb. 14: a) Reversibilität des Absorptionsspektrums des Jaffé-Adduktes in alkalischem Milieu durch Verminderung der OH^--Konzentration.

Spektrum 1: JA(MeOH) (0,465 mmol/l) in NaOH (100,0 mmol/l)
Meßbeginn: 3 Min. nach Lösen in NaOH

Spektrum 2: JA(MeOH)(0,465 mmol/l) in NaOH (100,0 mmol/l)
Meßbeginn: 128 Min. nach Lösen in NaOH

Spektrum 3: zu 1 ml JA(MeOH) (0,930 mmol/l) in NaOH (100,0 mmol/l) wird 128 Min. nach Lösen des Jaffé-Adduktes in NaOH 1 ml HCl (90,0 mmol/l) zugesetzt. Meßbeginn: 130 Min. nach Lösen in NaOH.

Zu Abb. 14: b) Spektrum des Endproduktes der Weiterreaktion des Jaffé-Adduktes (JA(MeOH): 0,465 mmol/l) in alkalischem Milieu - (72 Stunden nach Lösen in NaOH) -
Schichtdicke: 1 mm; T = 25°C

Wird einige Zeit (120 - 240 Min.) nach Lösen des Jaffé-Adduktes in NaOH(0,1 mol/l) verdünnte HCl (0,09 mol/l) zugesetzt, wobei die zugegebene Menge HCl so gewählt wird, daß ca. 90 % der OH^--Ionen neutralisiert werden, so kann eine erneute, kurzfristige, geringe Zunahme der Absorption im Bereich der längerwelligen Bande erzielt werden (Abb. 14). Wird die Neutralisation dagegen längere Zeit (72 Std.) nach Lösen des Jaffé-Adduktes in NaOH durchgeführt, so tritt nur noch eine schwache Zunahme der Absorption im längerwelligen Bereich auf, d.h. die Reversibilität des Absorptionsspektrums des Jaffé-Adduktes nimmt mit zunehmender Reaktionszeit im alkalischen Milieu ab.

Bei Ansäuern zerfällt das in alkalischer Lösung entstehende Folgeprodukt ebenso wie das Jaffé-Addukt. Die Zerfallsgeschwindigkeit nimmt jedoch mit Zunahme der dem Ansäuern vorausgegangenen Einwirkungsdauer von NaOH auf das Jaffé-Addukt ab. Nach Zerfall von JA(MeOH) bzw. JA(HCl) in saurem Milieu tritt - unabhängig von der Dauer der OH^--Einwirkung - stets wieder das Absorptionsspektrum von Kreatinin-Pikrat auf. Bei anschließender NaOH-Zugabe ist die Jaffé-Reaktion reversibel.

4.1.4. Struktur des Jaffé-Adduktes

Aufgrund der oben dargelegten eigenen Ergebnisse kann es als sicher angesehen werden, daß bei der Jaffé-Reaktion bei Pikrat-Überschuß als primäres Reaktionsprodukt das Dinatriumsalz eines Monoadduktes aus Kreatinin und Pikrat, ein Trinitrocyclohexadienat-Komplex, entsteht. Eine Bestätigung hierfür ist u.a. in dem Verhältnis der molaren Extinktionskoeffizienten der Maxima beider Absorptionsbanden des Jaffé-Adduktes (Tab. III) zu sehen, welches der für Trinitrocyclohexadienat-Komplexe geforderten Beziehung (92, 287) entspricht.

4.1.4.1. Ergebnisse der Kernresonanz-Spektroskopie

Bisher durchgeführte NMR-Untersuchungen zum Verhalten von Kreatinin in alkalischer Lösung sowie zur Struktur des bei der Jaffé-Reaktion primär entstehenden Molekülkomplexes ergaben folgende Beobachtungen:

A. Protonen-Resonanz:

1) In alkalischem Milieu kommt es zu einem raschen Protonen-Austausch an der Methylengruppe des Kreatinins (49, 160, 308)

2) In einem Reaktionsansatz der Jaffé-Reaktion fand sich neben den Signalen der aromatisch gebundenen Protonen des Pikrates, sowie neben den Signalen der Methylen- und Methylgruppe des Kreatinins:

a) eine Verschiebung und Intensitätsabnahme des Resonanzsignals der Methylenprotonen des Kreatinins (92, 171, 308)

b) das Resonanzsignal eines an Pikrat kovalent gebundenen Protons, bei gleichzeitiger Abnahme der Intensität der Resonanzsignale der aromatisch gebundenen Protonen (49, 92, 171, 308).

B. ^{13}C-Resonanz:

In einem Reaktionsansatz der Jaffé-Reaktion fand sich:

a) eine sehr starke Intensitätsabnahme des Resonanzsignals des Kohlenstoffs der Methylengruppe sowie eine Verschiebung und geringe Intensitätsabnahme des Resonanzsignals des Kohlenstoffs der Carbonylgruppe des Kreatinins (308).

b) ein Fehlen der Resonanzsignale von C-1 und eine Verschiebung der Resonanzen von C-4 des Pikrates (308).

4.1.4.2. Die Position der Kreatinin-Anlagerung an Pikrat

Die bisher bei NMR-Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse über die Struktur des Jaffé-Adduktes (s.o.) sind mit gewissem Vorbehalt zu betrachten, da diese Untersuchungen nicht am isolierten Reaktionsprodukt, sondern jeweils in einem Reaktionsansatz der Jaffé-Reaktion durchgeführt wurden und hier die Überlagerung der Resonanzen der verschiedenen nebeneinander vorliegenden Verbindungen zu Bestimmungsfehlern führen kann. Es kann jedoch aufgrund dieser Untersuchungen als gesichert angesehen werden, daß sich das Kreatinin-Molekül bei der Jaffé-Reaktion an ein unsubstituiertes Ring-C-Atom des Pikrates kovalent anlagert. Eine zusätzliche Bestätigung hierfür ist darin zu sehen, daß bei Substitution von C-3 und C-5 des Pikrates (3,5-Dimethylpikrat) im alkalischen Milieu keine Reaktion mit Kreatinin auftritt (49). Die Kreatinin-Anlagerung an ein unsubstituiertes Ring-C-Atom wird kinetisch und thermodynamisch begünstigt, da bei Anlagerung an C-1 aufgrund des großen Raumbedarfs des sperrigen Kreatinin-Moleküls eine starke Erhöhung der sterisch bedingten Ring-Spannung sowohl im Übergangszustand als auch im Grundzustand der Reaktion zu erwarten wäre.

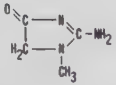
4.1.4.3. Die reaktive Gruppe des Kreatinins bei der Jaffé-Reaktion

Das Kreatininmolekül besitzt mehrere reaktive Gruppen. Aufgrund der bisher durchgeführten ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Untersuchungen (Kap. 4.1.4.1.) ist es als sicher anzusehen, daß die Carbonylgruppe und die Methylengruppe für die Reaktion des Kreatinin-Moleküls mit Pikrat bei der Jaffé-Reaktion von Bedeutung sind.

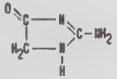
Vergleiche, inwieweit die Substituion der verschiedenen funktionellen Gruppen die Eigenschaft der Glycocyamidin-Verbindungen,mit alkalischer Pikratlösung einen farbigen Molekülkomplex zu bilden,beeinflußt, ergaben, daß eine Änderung der Substitution von N-1, N^2 und N-3 kaum Einfluß auf die Reaktion mit alkalischer Pikratlösung hat (s. Tab. IV). Bei Substitution des Sauerstoffs der Carbonylgruppe oder Substitution beider Methylen-Protonen geht jedoch die Fähigkeit der Glycocyamidinverbindungen verloren, mit Pikrat im alkalischen Milieu ein farbiges Addukt zu bilden. Bei Substitution eines Protons der Methylengruppe geht die Jaffé-positive Eigenschaft dann verloren, wenn der Substituent einen positiv-induktiven Effekt besitzt. Ein ähnliches Verhalten ist bei Glycocyamidin-Verbindungen zu beobachten, bei denen die aciden Eigenschaften der Methylen-Protonen durch den stark positiv-induktiven Effekt einer benachbarten funktionellen Gruppe eingeschränkt werden, wie z.B. bei ß-Alakreatinin oder bei ß-Methylguanidinopropionsäureanhydrid.

Die Grundvoraussetzung für das Jaffé-positive Verhalten der Glykocyamidine ist in dem Vorhandensein der Carbonylgruppe und mindestens eines aciden Protons der Methylengruppe zu sehen. Diese Grundvoraussetzung weist zusammen mit den bei NMR-Untersuchungen des Kreatinins in alkalischem Milieu gewonnenen Ergebnissen darauf hin, daß die NaOH-

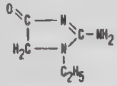
" JAFFÉ-POSITIV "



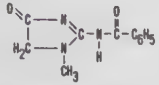
Kreatinin



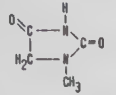
Glycocyamidin



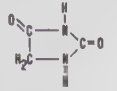
1-Aethylglycocyamidin
(Lempert (1959))



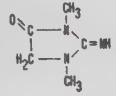
N^2-Benzoylkreatinin
(Greenwald, 1926
Lempert 1959;)



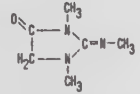
1-Methylhydantoin
(Lempert (1959))



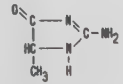
Hydantoin



3-Methylkreatinin
(Greenwald 1926; Benedict & Behre, (1936), Sullivan et al. 1956)

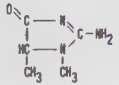


N^2,3-Dimethylkreatinin
(Greenwald (1926); Sullivan et al. 1956; Butler 1975)

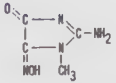


Alakreatinin
(Sullivan et al. (1956))

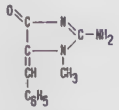
" JAFFÉ-NEGATIV "



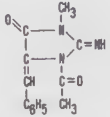
Homokreatinin
(Sullivan et al. (1956))



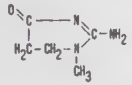
5-Isonitrosokreatinin
(Benedict & Behre, 1936), Lempert (1959)



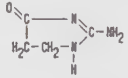
5-Benzylidenkreatinin
(Benedict & Behre (1936) Greenwald (1926))



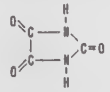
1-Acetyl-3-Methyl-5-Benzylidenglycocyamidin
(Butler (1975))



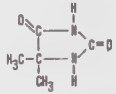
8-Methylguanidino-propionsäureanhydrid
(Sullivan et al. (1956)



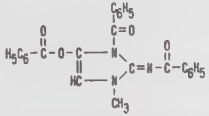
8-Alakreatinin
(Sullivan et al. (1956))



Parabansäure
(Weise & Tropp (1926); Lempert (1959))



5,5-Dimethylhydantoin
(Blaze et al. (1974))



Tribenzoylkreatinin
(Greenwald (1925), Lempert (1959))

Tab. IV: **Einfluß des Substituenten auf die Reaktion der Glykocyamidinverbindungen mit alkalischer Pikratlösung**

Zugabe bei der Jaffé-Reaktion zur Abspaltung eines Protons von der Methylengruppe führt und sich das hierdurch gebildete Kreatinin-Anion kovalent an Pikrat anlagert. Hinsichtlich der Struktur des Anions bestehen unterschiedliche Auffassungen (Tab. II) . Die im ^{13}C-NMR beobachtete Verschiebung der Resonanz des Kohlenstoffs der Carbonylgruppe (308) deutet auf Bildung eines Carbanions mit Resonanzstabilisierung hin (s. Kap. 3.1.4.).

Ein ähnliches Verhalten, d.h. Protonen-Abspaltung und nukleophile Anlagerung des Carbanions wurde bei der Reaktion anderer CH-acider Verbindungen, wie Aceton (152, 153, 167, 176, 177), Acetophenon (168), Cyclohexanon (168), 17-Ketosteroide (178) und der Cardenolide (178) mit Polynitroaromaten (1,3-Dinitrobenzol, 3,5-Dinitrobenzoesäure, 1,3,5-Trinitrobenzol, Pikrinsäure) im alkalischen Medium nachgewiesen.

4.1.4.4. Vergleichende Betrachtung: JA(MeOH)-JA(HCl)

Das aus dem methanolischen Reaktionsansatz ausgefallene Dinatriumsalz stellt das primäre Reaktionsprodukt der Jaffé-Reaktion dar. Bei Isolation des Jaffé-Adduktes durch Säurefällung ist eine Protonen-Anlagerung an dem Trinitrocyclohexadienat-Komplex zu erwarten, wobei a) eine Protonen-Anlagerung an C-2 des Pikrates (153), b) die Ausbildung einer Nitronsäure durch Protonen-Anlagerung an ein O-Atom der ortho-Nitrogruppe oder c) die Ausbildung der freien Säure des Reaktionsproduktes sowie außerdem d) eine zusätzliche Protonenanlagerung an den Guanidino-Stickstoff des Kreatinins in Frage kommt.

Eine Protonen-Anlagerung an C-2 des Pikrates konnte zwar bei dem durch Säurefällung isolierten Mononatriumsalz des bei der Reaktion von Aceton mit Pikrat in alkalischer Lösung entstehenden Adduktes (3-Acetonat-

Pikrat) nachgewiesen werden (153), jedoch ist diese Form der Protonen-Anlagerung bei JA(HCl) unwahrscheinlich, da hinsichtlich Löslichkeit, Stabilität und Verhalten im alkalischen Milieu zwischen dem von KABEYA (153) isolierten Mononatriumsalz und JA(HCl) deutliche Unterschiede bestehen. Bei JA(HCl) handelt es sich entweder um die freie Säure des Jaffé-Adduktes oder um eine Nitrosäure.

4.2. REAKTIONSMECHANISMUS DER JAFFÉ-REAKTION

4.2.1. Bedeutung der NaOH für die Jaffé-Reaktion

Allgemein wird die Bedeutung der NaOH für die Jaffé-Reaktion in ihrem Einfluß auf die Bildung des Kreatinin-Anions gesehen (50, 92, 171, 308). Wie die Untersuchungen über das Verhalten von Pikrinsäure in alkalischem Milieu gezeigt haben (s. Kap. 3.2.7.), kommen bei der Jaffé-Reaktion als Reaktionspartner des Kreatinin-Carbanions Pikrat oder 1-Hydroxy-Pikrat in Frage.

Folgende Beobachtungen weisen darauf hin, daß neben der Bildung von Kreatininat auch die Umsetzung von NaOH mit Pikrat für den Ablauf der Jaffé-Reaktion von Bedeutung ist:

I. Erst bei einem Pikrat/NaOH-Konzentrationsverhältnis von 1 : 16,5 werden für die Jaffé-Reaktion optimale Reaktionsbedingungen erreicht. Je nach Kreatininkonzentration beträgt das Kreatinin/NaOH-Konzentrationsverhältnis bei dieser OH^--Konzentration mindestens 1 : 2000 bis 1 : 20 000. Nach den hier durchgeführten Berechnungen beträgt der Monoaddukt-Anteil in diesem OH^--Bereich ca. 1,4 bis 2,2 %. Da bei diesem pH überwiegend C_1-Addukte vorliegen, ist je nach Kreatininkonzentration ein Kreatinin/1-Hydroxy-Pikrat-Verhältnis von mindestens 1 : 2 bis 1 : 20 zu erwarten.

II. Während Pikrinsäure bereits in wässriger, neutraler Lösung weitgehend als Pikrat vorliegt, wird zwischen der Bildung von 1-Hydroxy-Pikrat und der NaOH-Konzentration in einem ähnlichen NaOH-Konzentrationsbereich (0 - 250 mmol/l NaOH) eine lineare Beziehung gefunden, wie zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit der Jaffé-Reaktion und der Basenkonzentration (0 - 220 mmol/l NaOH) (s. Kap.: 5.3.1.3.)

In Verbindung mit der Tatsache, daß 1-substituierte Nitroaromate die nukleophile Addition weniger begünstigen, als deren C_1-Addukte, weisen diese Beobachtungen darauf hin, daß 1-Hydroxy-Pikrat trotz seines vergleichsweise geringen Anteils in der Lösung mit sehr großer Wahrscheinlichkeit der Reaktionspartner des Kreatinins bei der Jaffé-Reaktion ist. Eine Bestätigung hierfür ist das bei ^{13}C-NMR-Untersuchungen der Jaffé-Reaktion beobachtete Fehlen der Resonanzsignale von C-1 des Pikrates (308), was auf das überwiegende Vorliegen von 1-Hydroxy-Pikrat hinweist. Es ist zu erwarten, daß die Jaffé-Reaktion als Additions-Eliminations-Reaktion (22, 103, 216) abläuft, wobei 1-Hydroxy-3-Kreatininat-Pikrat das Intermediärprodukt ist. Die Jaffé-Reaktion gehört damit zu den Sonderfällen (22, 216) der nucleophilen aromatischen Substitution. In den meisten Fällen erfolgt bei der nucleophilen aromatischen Substitution die Abspaltung der nucleofugen Gruppe von dem gleichen C-Atom, an das sich die nucleophile Gruppe angelagert hat (sog. 1,1-Typ), wie z.B. bei der Anlagerung von OH^- an C-1 des 3-Hydroxy-Adduktes von 2,4,6-Trinitroanisol (22, 103, 216).

4.2.2. Reaktionsablauf (Tab. V)

Unter der Annahme, daß 1-Hydroxy-Pikrat der Reaktionspartner des Kreatinins ist, ergibt sich aufgrund der hier durchgeführten Überlegungen folgender Reaktionsablauf für die Jaffé-Reaktion:

I. Bildung von 1-Hydroxy-Pikrat

Da die Unterbrechung der cyclischen Konjugation einen vermehrten Abzug von π-Elektronen aus dem Phenylkern zu den Nitrogruppen zur Folge hat, führt die Basenanlagerung an C-1 trotz der zusätzlichen negativen Ladung und Einschränkung der koplanaren Anordnung der ortho-Nitrogruppen zu einer Positivierung des Ringes. Wie HMO-Berechnungen von CAVENG (59) für das C_1-Addukt von 2,4,6-Trinitroanisol mit Methanolat ergaben, resultiert hieraus eine Zunahme der Positivierung der unsubstituierten Ring-C-Atome um ca. 30 %. Während bei Pikrat die nukleophile Addition an den unsubstituierten Ring-C-Atomen aufgrund des positiv-induktiven und -mesomeren Effektes des Substituenten in C-1 erschwert ist, wird sie bei 1-Hydroxy-Pikrat durch die Ladungsverschiebung begünstigt. Die OH^--Anlagerung an C-1 führt dadurch zu einer "Aktivierung" des Pikrates.

II. Bildung eines Kreatinin-Carbanions

Die NaOH-Zugabe führt zur Abspaltung eines Protons von der Methylengruppe des Kreatinins, wodurch das Carbanion entsteht.

III. Anlagerung des Kreatinin-Carbanions an 1-Hydroxy-Pikrat und Abspaltung von OH^-

Bei der nukleophilen Addition des Kreatinin-Carbanions an ein unsubstituiertes Ring-C-Atom von 1-Hydroxy-Pikrat, die durch die relativ geringe π-Elektronenpopulation des Phenylkerns begünstigt wird (s.o.), entsteht ein Nitro-dinitropropenid-Komplex. Die Propenid-Komplexe

besitzen im langwelligen Bereich keine Absorptionsbande.
Die Diadduktbildung führt zu einer Einschränkung der Konjugation zwischen den Nitrogruppen, wobei die aus der Konjugation ausgeschaltete, zu den beiden sp^3-C-Atomen ortho-ständige Nitrogruppe durch die Lokalisierung der negativen Ladung zu einem Nitroanion wird.

Allgemein ist die Diadduktbildung von 1-substituierten Trinitroaromaten nur dann mit einer Zunahme der Stabilität verbunden, wenn bei dem Diaddukt - bedingt durch die Aufhebung der koplanaren Anordnung des Ringes - die sterische Kompression zwischen dem Substituenten an dem zentralen Propenid-C-Atom und den ortho-Nitrogruppen im Vergleich zur Ausgangsnitroverbindung deutlich herabgesetzt ist. Die Stabilität der Propenid-Komplexe nimmt hierbei mit der Größe des zentralen Propenid-Substituenten zu (287).

Bei 1-Hydroxy-3-Kreatininat-Pikrat wird zwar durch die Unterbrechung der cyclischen Konjugation die Aufhebung der koplanaren Anordnung des Ringes und dadurch eine Abnahme der sterischen Kompression ermöglicht, jedoch ist hier aufgrund des geringen Raumbedarfs des zentralen Propenid-Substituenten (H^+) an C-5 im Vergleich zur Ausgangsnitroverbindung keine signifikante Verminderung der sterischen Kompression und somit keine wesentliche Erhöhung der Stabilität zu erwarten. Weiterhin spricht folgendes für die Instabilität von 1-Hydroxy-3-Kreatininat-Pikrat:

1. Zwischen dem Kreatinin-Molekül, dessen Bindung mit Pikrat Doppelbindungscharakter mit verkürzter Bindungslänge hat (282), und den beiden ortho-Nitrogruppen des Pikrates ist ein Überlappen der Wirksphären zu erwarten. Aus der sterischen Kompression, die zu einer Zunahme des Verdrillungswinkels der Nitrogruppen führt, resultiert sowohl im Grund- wie auch im Übergangszustand eine Erhöhung der Ringspannung (59, 287).

2. Die Anlagerung des Kreatinin-Carbanions an 1-Hydroxy-Pikrat führt zu einer Zunahme der negativen Ladung im Phenylkern. Diese kann jedoch durch die Unterbrechung der cyclischen Konjugation im Diaddukt und durch die sterische Hinderung des negativ-mesomeren Effektes der ortho-Nitrogruppen durch das angelagerte Kreatinin-Molekül nur unzureichend von den Nitrogruppen übernommen werden. Dadurch nimmt die Tendenz zur Abspaltung eines Substituenten zu.

Da die Hydroxylgruppe an C-1 von 1-Hydroxy-3-Kreatininat-Pikrat leichter nukleofug austritt als das Kreatinin-Anion - zwischen den π-Elektronen des Phenylkerns und den π-Elektronen des α, ß-ungesättigten Lactamrings des Kreatinins ist eine Konjugations-Wechselwirkung zu erwarten -, geht das Diaddukt unter Abspaltung der OH^--Gruppe in den thermodynamisch stabileren Trinitrocyclohexadienat-Komplex, das Jaffé-Addukt, über.

Die Annahme, daß die Jaffé-Reaktion über ein metastabiles Intermediärprodukt abläuft, findet in polarographischen Untersuchungen von BLASS & THIBERT (31, 32) eine Bestätigung. Hierbei konnte im Reaktionsansatz der Jaffé-Reaktion unmittelbar nach Start der Reaktion eine vorübergehende Rückbildung der ersten Nitroreduktionswelle des Pikrates nachgewiesen werden. Dies wird als Hinweis für die vorübergehende Umwandlung einer ortho-Nitrogruppe (C-2) in ein Nitroanion angesehen.

Die geringe Aktivierungsenergie für die Jaffé-Reaktion - von BARTELS & CIKES (11) wurde ein Wert von 2,6 kcal ermittelt - ist auf die vermehrte Positivierung (= Aktivierung) der unsubstituierten Ring-C-Atome durch die OH^--Anlagerung an C-1 des Pikrates zurückzuführen, wodurch die nukleophile aromatische Addition erleichtert wird.

4.2.3. Die Weiterreaktion des Jaffé-Adduktes (Tab. V)

Wie aus der Änderung des Absorptionsspektrums des Jaffé-Adduktes in alkalischer Lösung in Abhängigkeit von der Zeit zu ersehen (Abb. 14), tritt im alkalischen Milieu eine Weiterreaktion des Jaffé-Adduktes auf. In Anlehnung an die Reaktionswege, die für die Weiterreaktion der bei der nukleophilen Addition von Aceton und anderer CH-acider Verbindungen an Polynitroaromate entstehenden primären Reaktionsprodukte in alkalischer Lösung gefunden und durch ^{1}H-NMR-Untersuchungen bestätigt wurden (32, 152, 167, 168, 177, 178), kommen für die Weiterreaktion des Jaffé-Adduktes im alkalischen Reaktionsansatz folgende Möglichkeiten in Frage:

1. Ausbildung eines Propenid-Komplexes durch Anlagerung von OH^- an C-5 des Pikrates ($C_{Pikrat} \gg C_{Kreatinin}$) *
2. Diadduktbildung durch Anlagerung eines weiteren Kreatinin-Carbanions an C-5 des Pikrates ($C_{Pikrat} \geqq C_{Kreatinin}$) *
3. Oxydation des Molekülkomplexes, d.h. Abspaltung des zweiten aciden Protons von der Methylengruppe des Kreatinins, unter Ausbildung einer "Zimmermann-Verbindung" (178).

Die hier durchgeführten Untersuchungen zur Weiterreaktion des Jaffé-Adduktes (Kap. : 4.1.3.3.) ergaben:

a) Durch Verminderung der OH^--Konzentration ist einige Zeit nach Lösen des Jaffé-Adduktes in NaOH eine partielle Reversibilität des Absorptionsspektrums des Jaffé-Adduktes möglich. Das Ausmaß der Reversibilität nimmt hierbei mit Zunahme der Reaktionszeit in alkalischem Milieu ab.

b) Unabhängig von der Reaktionszeit des Jaffé-Adduktes in alkalischer Lösung zerfällt das entstehende Folgeprodukt bei Ansäuern unter Bildung von Kreatinin-Pikrat. Hierbei nimmt jedoch die Zerfallsgeschwindigkeit mit Zunahme der Reaktionszeit in alkalischer Lösung ab.

---

* C = Konzentration

Die partielle Reversibilität des Absorptionsspektrums des Jaffé-Adduktes bei Verminderung der OH^--Konzentration im Reaktionsansatz weist ebenso wie die lineare Beziehung zwischen Abnahme des Extinktionskoeffizienten der längerwelligen Bande und Anstieg der OH^--Konzentration (s. Kap. 5.3.1.2.2.), die bereits 3 Min. nach Lösen des Jaffé-Adduktes in NaOH nachweisbar ist, darauf hin, daß das Jaffé-Addukt durch Anlagerung einer OH^--Gruppe an ein unsubstituiertes Ring-C-Atom in einen thermodynamisch stabileren Propenid-Komplex (s. o.) übergehen kann. Daneben kann bei höherer Kreatininkonzentration auch eine Stabilisierung des Jaffé-Adduktes durch Anlagerung eines zweiten Kreatinin-Carbanions an C-5 erfolgen. Derartige Diaddukte wurden in kristalliner Form isoliert (32, 113, 169, 170, 266). Durch NMR-Untersuchungen konnten drei Isomere des 3,5-Dikreatininat-Pikrates identifiziert werden (169, 170). Die Kreatininat- und OH^--Anlagerung an das Jaffé-Addukt sind konkurrierende Formen der Weiterreaktion, die durch die Kreatinin- und OH^--Konzentration bestimmt werden. Die Diadduktbildung ist mit einer Abnahme der Absorption im Bereich der längerwelligen Bande des Jaffé-Adduktes verbunden.

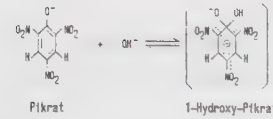
Neben dem Diaddukt können weitere stabile Verbindungen gebildet werden. Hierbei ist eine "Zimmermann-Verbindung" - Ausbildung einer Doppelbindung zwischen Kreatinin und Pikrat sowie chinoide Struktur des Nitroaromaten - zu diskutieren, die durch Abspaltung des zweiten aciden Protons der Methylengruppe des Kreatinins entstehen kann. Derartige Verbindungen wurden als Folgeprodukte bei der Weiterreaktion von Molekülkomplexen gefunden, die im alkalischen Milieu durch nukleophile Addition von Aceton bzw. der 17-Ketosteroide an Polynitroaromate gebildet werden (178).

Die Umsetzung von Kreatinin mit Pikrat in alkalischem Milieu ist quantitativ nicht vollständig; es stellt sich ein Reaktionsgleichgewicht ein,

wodurch eine Hydrolyse des Kreatinins möglich ist. Da sich das bei der Hydrolyse entstehende Kreatin ebenfalls an Pikrat anlagern kann (s. Kap. 6.1.4.1.), ist als Nebenreaktion die zunehmende Bildung eines Kreatin-Pikrat-Adduktes zu erwarten. Die α-Methylengruppe des Kreatins stellt eine weitere reaktionsfähige Gruppe dar, die sich nach Protonen-Abspaltung an das zweite unsubstituierte C-Atom des Pikrates nukleophil anzulagern vermag, so daß hier als Weiterreaktion eine intramolekulare Cyclisierung unter Bildung eines bicyclischen Adduktes nicht auszuschließen ist. Bicyclische Verbindungen wurden in alkalischer Lösung als Folgeprodukte bei der Weiterreaktion der Addukte nachgewiesen, die bei Reaktion von Aceton und anderer α-Methylen-Ketoverbindungen, die eine zweite reaktionsfähige nukleophile Gruppe besitzen, mit Polynitroaromaten im alkalischen Milieu entstehen (152, 167, 168, 288). Das Absorptionsspektrum der bicyclischen Verbindungen, die eine große Stabilität besitzen, zeigt im sichtbaren Bereich lediglich eine Bande mit Maximum im kürzerwelligen Bereich (152, 167).

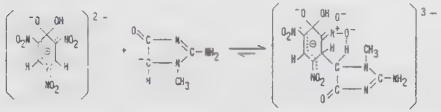
Bei der Reaktion von Kreatinin mit Pikrat in alkalischer Lösung läuft somit eine mehrstufige Reaktion ab, wobei das Jaffé-Addukt ein Zwischenprodukt ist, das zu einem stabileren Propenid-Komplex weiterreagiert. Sowohl die Primärreaktion, d.h. die Bildung des Jaffé-Adduktes, als auch die Weiterreaktion werden hierbei von der OH^--Konzentration beeinflußt.

I.) BILDUNGSREAKTION DES JAFFÉ-ADDUKTES

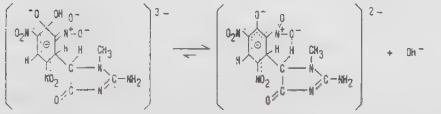


Pikrat — 1-Hydroxy-Pikrat

Kreatinin — Kreatininat

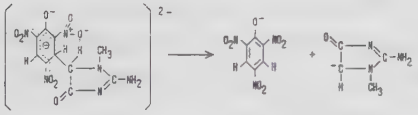


1-Hydroxy-Pikrat — Kreatininat — 1-Hydroxy-3-Kreatininat-Pikrat

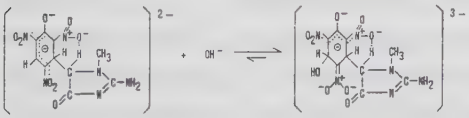


1-Hydroxy-3-Kreatininat-Pikrat — 3-Kreatininat-Pikrat ("Jaffé-Addukt")

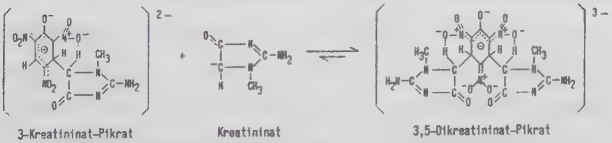
II.) WEITERREAKTION DES JAFFÉ-ADDUKTES



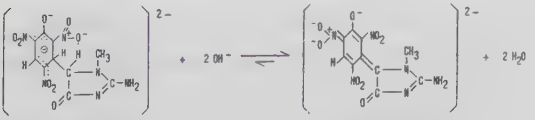
3-Kreatininat-Pikrat — Pikrat — Kreatininat



3-Kreatininat-Pikrat — 3-Kreatininat-5-Hydroxy-Pikrat

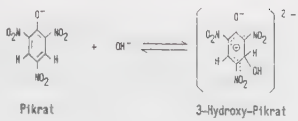


3-Kreatininat-Pikrat — Kreatininat — 3,5-Dikreatininat-Pikrat



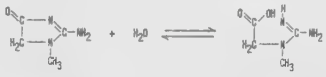
3-Kreatininat-Pikrat — 3-Kreatininat-Pikrat ("Zimmermann-Addukt")

III.) NEBENREAKTIONEN

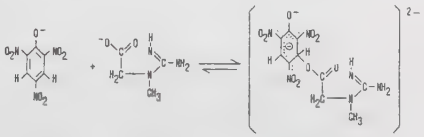


Pikrat — 3-Hydroxy-Pikrat

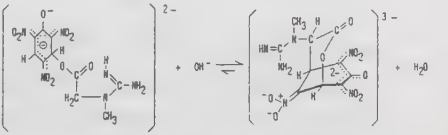
3-Hydroxy-Pikrat — 3,5-Dihydroxy-Pikrat



Kreatinin — Kreatin



Pikrat — Kreatinat — 3-Kreatinat-Pikrat



3-Kreatinat-Pikrat — 3,5-Kreatinat-Pikrat (bicyclisches Addukt)

Tab. V: Reaktionsablauf der Jaffé-Reaktion und der Nebenreaktionen bei der Umsetzung von Kreatinin mit Pikrat in wässriger, alkalischer Lösung

5. UNTERSUCHUNGEN ZUR OPTIMIERUNG DER REAKTIONS- UND MESSBEDINGUNGEN DER JAFFÉ-REAKTION

Setzt man bei der Jaffé-Reaktion als Reaktanten Pikrat bzw. 1-Hydroxy-Pikrat und Kreatininat voraus, so wird die Problematik deutlich, die mit der Entwicklung optimaler Reaktionsbedingungen verknüpft ist.
Da das Jaffé-Addukt mit den Reaktanten im Gleichgewicht steht, ist seine Ausbeute dann am höchsten, wenn möglichst viel 1-Hydroxy-Pikrat und Kreatininat vorliegen. Bei steigender Basenkonzentration nimmt zwar die Bildung von Kreatininat zu, die Ausbeute an 1-Hydroxy-Pikrat jedoch ab, so daß bei der Jaffé-Reaktion eine für beide Reaktanten optimale OH^--Konzentration gewählt werden muß. Aufgrund unserer Untersuchungen zur Wechselwirkung von Pikrat mit OH^- sollte dieBasenkonzentration aber nicht größer als 230 mmol/l sein.

Ein weiteres Problem tritt bei der spektralphotometrischen Messung auf, die vor dem Hintergrund der Pikrat- und Hydroxy-Pikratabsorption durchgeführt wird. Als Meßpunkte kommen die Maxima der beiden Absorptionsbanden des Jaffé-Adduktes in Frage. Im Maximum der kürzerwelligen Bande ist aufgrund der Größe des Extinktionskoeffizienten ($\varepsilon_{408} = 1,89 \cdot 10^7$ cm^{2}mo
eine Messung mit ausreichender Empfindlichkeit möglich. Bei dieser Wellenlänge ist die Hintergrundabsorption gegenüber einer Verschiebung der NaOH-Konzentration und damit gegenüber einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen den Pikrinsäurederivaten innerhalb gewisser Grenzen unempfindlich, da sich die Extinktionskoeffizienten von Pikrat und Monohydroxy-Pikrat in diesem Bereich nur unwesentlich unterscheiden und die Extinktion von Dihydroxy-Pikrat bis zu einer OH^--Konzentration von 0,5 mol/l
weitgehend vernachlässigt werden kann. Das Verhältnis zwischen dem Extinktionskoeffizienten des Jaffé-Adduktes und den Extinktionskoeffizienten von Pikrat bzw. Hydroxy-Pikrat ist jedoch in diesem Bereich ungünstig ($\varepsilon_{408\ JA} : \varepsilon_{408\ Pi^-} = 2:1$). Durch die hohe Hintergrundabsorption wird

der Meßfehler so groß und die Nachweisgrenze so eingeschränkt, daß dieser Wellenlängenbereich für Messungen nicht herangezogen werden kann.

Im Maximum der längerwelligen Bande ist zwar der Extinktionskoeffizient geringer ($\varepsilon_{485} = 1,36 \cdot 10^7\ cm^2 mol^{-1}$), das Verhältnis zur Hintergrundabsorption jedoch günstiger. Bei 0,1 mol/l NaOH und 25°C beträgt das Verhältnis des Extinktionskoeffizienten des Jaffé-Adduktes zum Extinktionskoeffizienten der alkalischen Pikratlösung ca. 98 : 1. Von Nachteil ist hier lediglich die Abhängigkeit der Hintergrundabsorption von der OH^--Konzentration, da der Extinktionskoeffizient von Hydroxy-Pikrat bei 485 nm ca. 24fach größer ist als der Extinktionskoeffizient von Pikrat.

Der Wahl der OH^--Konzentration und der Wellenlänge kommt daher eine entscheidende Bedeutung für die Genauigkeit und Empfindlichkeit bei der Kreatininbestimmung mit der Jaffé-Reaktion zu. Ähnliches ist bei der Pikratkonzentration und der Temperatur zu erwarten. Dies kommt auch in den unterschiedlichen Meinungen über den Einfluß der verschiedenen Reaktions- und Meßbedingungen auf die Jaffé-Reaktion zum Ausdruck, die nachfolgend in Verbindung mit den eigenen Messungen diskutiert werden.

Zur Entwicklung einer Versuchsanordnung wurden verschiedene, in der Literatur aufgeführte Meßansätze nachvollzogen. Für unsere Untersuchungen wurden folgende Konzentrationen im Reaktionsansatz gewählt: Kreatinin: 0,0375 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l; Pikrat: 4,5 mmol/l. Die einzelnen Parameter wurden für die verschiedenen Fragestellungen jeweils variiert.

5.1. DIE MESSWELLENLÄNGE

Für die Wellenlänge, bei der das Reaktionsprodukt der Jaffé-Reaktion den größten Extinktionskoeffizienten besitzt, werden Werte zwischen 475 nm (85, 205, 248) und 510 nm (75) angegeben. Da jedoch von den meisten Autoren (41, 70, 143, 231, 266) im Bereich des Extinktionsmaximums eine unzureichend lineare Beziehung zwischen Kreatininkonzentration und Extinktion beobachtet wurde und in diesem Bereich außerdem die Absorption des Untergrundes noch relativ groß ist, werden zur Kreatininbestimmung überwiegend Wellenlängen herangezogen, bei denen zwar die Empfindlichkeit geringer, die Linearität jedoch ausreichend und die Absorption des Pikratuntergrundes vergleichsweise niedrig ist (69, 70, 138, 143, 163, 199, 231, 248, 262, 266, 267). Für die Messung werden Wellenlängen von 490 (12, 70) bis 530 nm (26) empfohlen.

Die unterschiedlichen Angaben über die Lage des Absorptionsmaximums beruhen z.T. darauf, daß die Extinktion des Jaffé-Adduktes bisher nur im Reaktionsansatz bestimmt wurde, wobei die Messungen gegen H_2O erfolgten. Da jedoch im Reaktionsansatz mindestens noch zwei weitere Verbindungen vorliegen - Pikrat und Hydroxy-Pikrat -, die im Bereich unter 510 nm eine starke Absorption zeigen, können auch bei Messung gegen H_2O methodische Fehler zu unterschiedlichen Werten führen.

Die durch Differenzmessung gegen den Leerwert im Doppelstrahlverfahren erhaltenen Absorptionsspektren für das Reaktionsprodukt der Jaffé-Reaktion im langwelligen Bereich (69, 70, 91, 101, 197, 205, 248, 259) sind sehr kritisch zu betrachten. Da die Absorption von Pikrat im Bereich unter 500 nm stark zunimmt, kann bei Messung im Doppelstrahlverfahren gegen den Leerwert durch die Abnahme der Referenzenergie ein starker Abfall der Absorption der Probe vorgetäuscht werden. Das dadurch verursachte scheinbare Maximum liegt hierbei um so weiter im langwelligen Bereich, je höher die Pikratkonzentration ist.

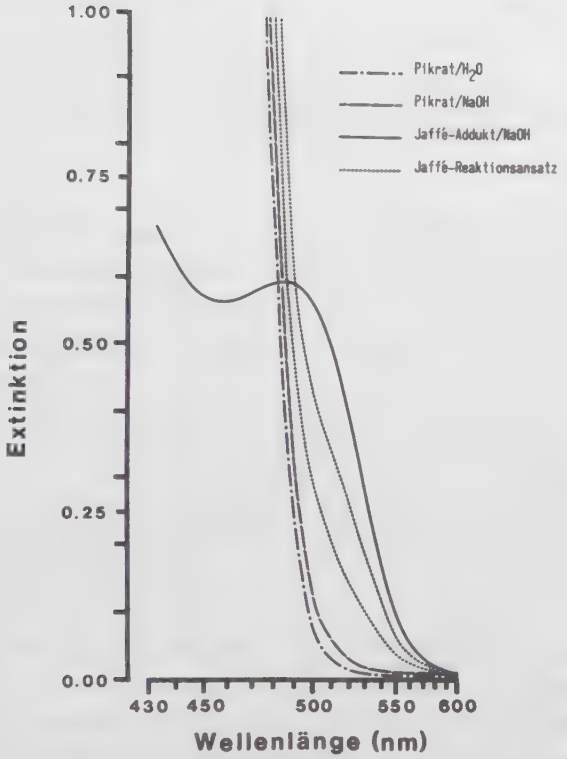


Abb. 15: Absorptionsspektrum zwischen 430 und 600 nm:
a) Jaffé-Addukt in NaOH (JA(MeOH): 46,5 µmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l)
b) Jaffé-Reaktionsansatz (Kreatinin: 15,6 u. 62,5 µmol/l; Pikrat: 4,5 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l)
c) alkal. Pikratlösung (Pikrat: 4,5 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l)
d) wässrige Pikratlösung (Pikrat: 4,5 mmol/l)

Referenz: H_2O; Schichtdicke: 10 mm;
T: 25°C

Bei 25°C hat die langwellige Bande des isolierten Jaffè-Adduktes ihr Maximum bei 483 nm (Abb. 15). Die Lage des Maximums ist temperaturabhängig - ein Temperaturanstieg bedingt eine geringe bathochrome Verschiebung -, jedoch unabhängig von der Konzentration des Jaffé-Adduktes.

Im Bereich des Maximums zeigt die "Jaffè-Bande" einen plateau-ähnlichen Verlauf. Extinktionsmessungen im Bereich über 500 nm sind mit einer deutlichen Abnahme der Meßempfindlichkeit verbunden (Tab. VI), da das Spektrum hier bereits in Form einer Flanke verläuft (Abb. 15).

Wellenlänge (nm)	Empfindlichkeitsverlust (%)
480	0,32
483	0,0
485	0,23
490	0,83
495	2,38
500	6,21
510	17,60
520	36,20
530	55,50
540	72,60

Tab. VI: Empfindlichkeitsverlust bei Messung außerhalb des Absorptionsmaximums (483 nm) des Jaffè-Adduktes (T: 25°C)

Für die Untersuchungen zur Jaffé-Reaktion wird von uns der Wellenlängenbereich zwischen 480 und 500 nm gewählt, da das Jaffé-Addukt in diesem Bereich den größten Extinktionskoeffizienten besitzt und hier, aufgrund

des plateau-artigen Verlaufes der Absorption, auch eine ausreichende Reproduzierbarkeit der Meßwerte gewährleistet ist. Die Beziehung zwischen Kreatininkonzentration und Extinktion (s. Kap. 5.3.4.3.1.) ist bei dieser Wellenlänge in einem großen Konzentrationsbereich weitgehend linear.

Zur Vermeidung von Fehlern durch Konzentrationsunterschiede zwischen Probe und Leerwert sowie zur besseren Beurteilung der Reaktionskinetik wurden die Messungen überwiegend gegen H_2O durchgeführt. Durch den steilen Verlauf des Pikrat- und Hydroxy-Pikratspektrums im Bereich zwischen 480 und 500 nm (s. Tab. VII), können jedoch auch bei Messung gegen H_2O sehr leicht Wellenlängenfehler auftreten.

5.2. DIE PROBLEMATIK DER EXTINKTIONSMESSUNG IM BEREICH EINER "FLANKE"

Bei Extinktionsmessung im Bereich einer "Flanke" kann die Reproduzierbarkeit der Meßwerte durch Wellenlängenfehler sehr stark eingeschränkt werden, da bereits kleinste Abweichungen bei der Einstellung der Wellenlänge im Verlaufe einer Messung bzw. einer Meßreihe zu einer Änderung der gemessenen Extinktion führen. Diese Abweichungen können auch durch Temperaturschwankungen hervorgerufen werden, die über eine Veränderung der mechanischen Führung des Monochromators minimale Verschiebungen der Monochromatoreinstellung verursachen.

Eine störungsfreie und reproduzierbare Messung im Bereich der "Flanke" wurde auf folgende Weise erreicht:

1. Messung bei konstanter Raumtemperatur.
2. Thermostatisierung des Monochromators, wobei die Temperatur auf einen Wert ($40^{\circ}C$) eingestellt wurde, der über der Temperatur ($37^{\circ}C$ - $38^{\circ}C$) lag, die bei längerer Betriebsdauer

durch Abwärme von Motoren (Schreiber- und Spaltsteuerung) und Röhren im Photometer auftrat.

3. Reproduzierbare Einstellung der Wellenlänge durch Verwendung eines Photofilters oder einer weitgehend stabilen Eichlösung, deren Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich zwischen 480 und 510 nm ebenfalls in Form einer steilen Flanke verlaufen.

Der Filter und die für die verschiedenen Wellenlängenbereiche verwendeten Eichlösungen (Schichtdicke: 10 mm) zeigen folgende Extinktionsänderung:

1. 479 nm bis 486 nm: Kaliumchromat(62,696 mmol/l);
   $\Delta E \left[E_{479} - E_{486}\right] = 0.64$
2. 484 nm bis 490 nm: Kaliumchromat (101,403 mmol/l);
   $\Delta E \left[E_{484} - E_{490}\right] = 0.68$
3. 488 nm bis 496 nm: Kaliumbichromat (9,878 mmol/l);
   $\Delta E \left[E_{488} - E_{496}\right] = 0.63$
4. 496 nm bis 505 nm: Photofilter (gelb-mittel);
   $\Delta E \left[E_{496} - E_{505}\right] = 1.39$

Der Filter, sowie die Konzentrationen der Eichlösungen wurden jeweils so gewählt, daß ihre Extinktionsänderung stets wesentlich größer war, als die Extinktionsänderung der Pikratbande. Auf diese Weise ließen sich zwischen 480 und 500 nm gut reproduzierbare Messungen durchführen. Der Einfluß der Pikratkonzentration auf die "Steilheit" der Pikratbande in diesem Wellenlängenbereich ist aus Tab. VII zu ersehen.

Pikrat (mmol/l)	Δ E ($E_{480} - E_{500}$)
37,50	6.02
6,25	1.08
4,50	0.72
0,625	0.102

Tab. VII: Beziehung zwischen Pikratkonz. und Extinktionsänderung im Wellenlängenbereich von 480 - 500 nm (Schichtdicke: 10 mm)

Durchführung der Eichung:
Vor Beginn einer Meßreihe wird nach Einstellen der jeweiligen Wellenlängedie Eichlinie, d.h. die Extinktion der für den entsprechenden Bereich verwendeten Eichlösung bzw. des Filters bei dieser Wellenlänge bestimmt. Im Verlaufe der Meßreihe kann dann mit Hilfe der Eichlösung bzw. des Filters ein "Driften" erkannt und die Wellenlänge, d.h. die Eichlinie, neu eingestellt werden.

5.3. DIE REAKTIONSBEDINGUNGEN

5.3.1. Die NaOH-Konzentration

Hinsichtlich des Einflusses der NaOH-Konzentration auf den Extinktionskoeffizienten der Jaffé-Reaktion bestanden z.T. sehr unterschiedliche Auffassungen. Anfangs hatte man der Basenkonzentration kaum Bedeutung zugemessen und lediglich die alkalische Reaktion der Probe als ent-

scheidend für die Jaffé-Reaktion angesehen (246). BONSNES & TAUSSKY (41) wiesen 1945 erstmals darauf hin, daß zu hohe OH^--Konzentrationen zu einer Abnahme des Extinktionskoeffizienten führen. Spätere Untersuchungen (29, 76, 231, 257) bestätigten diese Beobachtung. LØKEN [1954] (197) und später auch andere Untersucher (11, 26, 70, 75, 138, 172, 259, 267) beobachteten, daß der Extinktionskoeffizient der Jaffé-Reaktion nur in einem umschriebenen NaOH-Konzentrationsbereich ein Maximum besitzt. Für die Basenkonzentration im Reaktionsansatz, bei der die stärkste Farbentwicklung erreicht wird, werden Werte zwischen 28 mmol/l (26, 138) und 153 mmol/l NaOH (70, 172, 267) angegeben.

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Meßwerte und Schaffung optimaler Reaktionsbedingungen wird bei einigen Bestimmungsmethoden durch Zugabe von Pufferlösungen, die nicht mit Pikrat reagieren, im Reaktionsansatz ein pH eingestellt, bei dem die Farbentwicklung maximal ist (26, 132, 296). Für den pH werden Werte von 12,24 (132) bzw. 12,4 (138, 296) und 12,5 (26) genannt.

BIELIK & GUSTAFIKOVA [1966] (28) und später BRIDDON [1973] (45) beschrieben ein Verfahren, bei dem die Jaffé-Reaktion zur Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit mit einer hohen NaOH-Konzentration (1,25 bzw. 1,65 mol/l) gestartet und anschließend durch Zugabe eines Phosphat-Puffers ein für die Extinktion optimaler pH eingestellt wird.

Weiterhin wurden Verfahren entwickelt, bei denen durch optimale Einstellung des pH des Reaktionsansatzes die Kreatininbestimmung ohne Mitreaktion der störenden Chromogene und ohne Enteiweißung durchgeführt werden kann (132, 248, 317). Hierzu wird ein pH von 12,1 (132) bzw. 12,0 (248) bzw. 11,5 (317) mit Pufferlösungen eingestellt (s. auch Kap. 7.1.3.).

5.3.1.1. Versuchsdurchführung

a) Einfluß der OH^--Konzentration auf das Spektrum des Jaffé-Adduktes:

JA(MeOH) wurde in H_2O bzw. in wässriger NaOH verschiedener Konzentration gelöst. Die Konzentration von JA(MeOH) betrug jeweils 0,465 mmol/l. Die Lösungsmittel wurden vor dem Zugeben von JA(MeOH) auf die Meßtemperatur von 35°C gebracht. Schichtdicke: 1mm; Messung gegen das Lösungsmittel.

b) Einfluß der OH^--Konzentration auf die Jaffé-Reaktion:
0,2 ml Kreatinin (0,5 mmol/l) + 2 ml HPi (7,2 mmol/l; bzw. 60 mmol/l)+ 1 ml NaOH (abgestufte Konzentration)
Temperatur: 35°C; Schichtdicke: 10 mm; Messung gegen H_2O sowie gegen H_2O/HPi/NaOH, wobei die HPi- und NaOH-Konzentration jeweils mit der Konzentration der Probe identisch war.

1. Messung gegen H_2O: 481 nm; Eichlösung: Kaliumchromat (62,69 mmol/l);
2. Messung gegen H_2O/HPi/NaOH:
   7,2 mmol/l Pikrat: 486 nm; Eichlösung: Kaliumchromat (62,69 mmol/l);
   60 mmol/l Pikrat: 496 nm; Einstellung der Eichlinie mit Filter (gelb-mittel).

5.3.1.2. Einfluß der OH^--Konzentration auf das Jaffé-Addukt

5.3.1.2.1. Verlauf des Absorptionsspektrums

Bei steigender OH^--Konzentration tritt eine leicht hypsochrome Verschiebung des Maximums der kürzerwelligen Bande auf; die Lage der längerwelligen "Jaffé-Bande" zeigt dagegen keine Abhängigkeit von der OH^--Konzentration (Abb. 13).

5.3.1.2.2. Extinktionskoeffizient

Der Extinktionskoeffizient der kürzerwelligen Bande wird durch eine Änderung der OH^--Konzentration nicht signifikant beeinflußt.
Im Bereich der längerwelligen "Jaffé-Bande" führt eine Zunahme der OH^--Konzentration zu einer Abnahme der Absorption, wobei zwischen der OH^--Konzentration(x) und dem Extinktionskoeffizienten (y) des Maximums (485 nm) bis zu einer OH^--Konzentration von 625 mmol/l eine lineare Beziehung gefunden werden konnte (Abb. 18) : $y = -0,0136\,x + 14,365$; $r \geq 0,999$.

Zwischen dem Verhältnis (y) der molaren Extinktionskoeffizienten der Maxima der kürzerwelligen und der längerwelligen Bande und der OH^--Konzentration im Meßansatz (x) ergab sich für den OH^--Konzentrationsbereich von 10 mmol/l bis 200 mmol/l folgende Beziehung:
$y = 1,553\,x + 1,336$; $r = 0,997$.
Im Konzentrationsbereich zwischen 225 und 625 mmol/l NaOH tritt dann erneut eine lineare Beziehung zwischen dem Intensitätsverhältnis der beiden Banden und der Basenkonzentration auf: $y = 3,714x + 0,868$; $r = 0,999$.

5.3.1.2.3. "Stabilität" des Jaffé-Adduktes

Während das Jaffé-Addukt nach Lösen in wässriger, neutraler Lösung langsam zerfällt, stellt sich im alkalischen Milieu in Abhängigkeit von der OH^--Konzentration ein Gleichgewicht zwischen Neubildung und Zerfall ein.
Die Zerfallsgeschwindigkeit wurde durch das Verhältnis der Extinktion, die 32 Min. nach Lösen von JA(MeOH) in NaOH bei 485 nm bestimmt wurde, zu der 3 Min. nach Lösen gemessenen Extinktion charakterisiert.

Es zeigt sich, daß ein Anstieg der OH^--Konzentration zu einer Zunahme der "Stabilität" des Jaffé-Adduktes führt (Abb. 16).

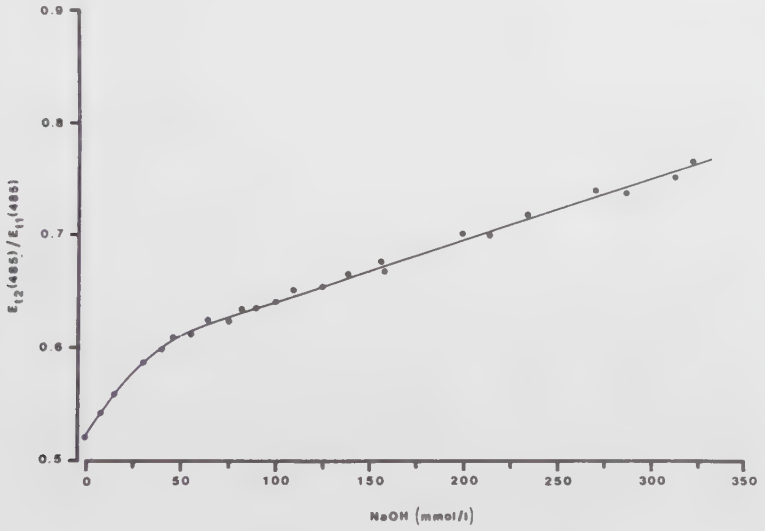


Abb. 16: Einfluß der OH^--Konzentration auf die "Stabilität" des Jaffé-Adduktes. Der Zerfall von JA(MeOH) wird durch das Extinktionsverhältnis E(t2)/E(t1) im Bereich der Jaffé-Bande charakterisiert.
(t_1 = 3 Min.; t_2 = 32 Min. nach Lösen von JA(MeOH) (0,465 mmol/l) in NaOH verschiedener Konzentration; T 25°C)

5.3.1.3. Einfluß der OH^--Konzentration auf die Jaffé-Reaktion (Abb. 18, Abb. 19)

5.3.1.3.1. Reaktionsgeschwindigkeit

Die Bildungsgeschwindigkeit des Jaffé-Adduktes ist u.a. von der Konzentration der Reaktanten Kreatininat und 1-Hydroxy-Pikrat abhängig, die wiederum durch die NaOH-Konzentration bestimmt wird. Als Maß für die initiale Reaktionsgeschwindigkeit (Rg) wurde $E_{1/2\ max}/\Delta t_o$ anstelle des

exakten Wertes $\left(\frac{dE}{dt}\right)_o$ gewählt (Erl. s. Abb. 17). Erwartungsgemäß ist ein Anstieg der Basenkonzentration mit einer Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit verbunden. Je nach Pikratkonzentration fand sich zwischen Reaktionsgeschwindigkeit (Rg) und OH^--Konzentration (x) folgende lineare Beziehung:

4,5 mmol/l Pikrat: $Rg = 0,042\ x + 0,132;\ r \geq 0,999$

37,5 mmol/l Pikrat: $Rg = 0,242\ x + 0,398;\ r = 0,998$

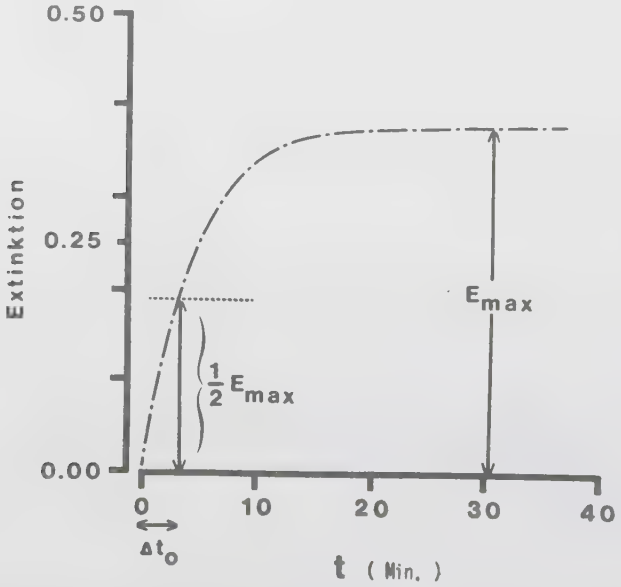


Abb. 17: Erläuterung zur Bestimmung von $E_{1/2\ max}/\Delta t_o$
(Die Messung erfolgt jeweils gegen den Leerwert (H_2O/HPi/NaOH))

Bei 4,5 mmol/l Pikrat wurde die lineare Beziehung bis 250 mmol/l NaOH gefunden. Bei höherer NaOH-Konzentration wird initial wieder zunehmend weniger Jaffé-Addukt gebildet. Die ähnlichen Konzentrationsbereiche, in denen sowohl zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit der Jaffé-Reaktion und der NaOH-Konzentration als auch zwischen der Bildung von 1-Hydroxy-Pikrat und der NaOH-Konzentration - bei 481 nm

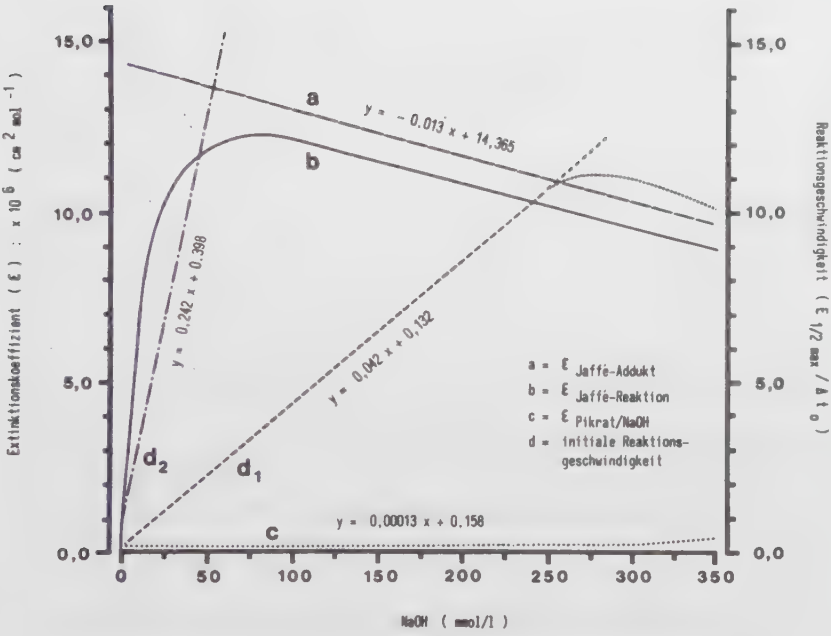


Abb. 18: Einfluß der OH^--Konzentration auf die Jaffé-Reaktion:

a) Einfluß der OH^--Konzentration auf ε_{485} von JA(MeOH) (0,465 mmol/l)
$y = -0,013\ x + 14,365$; $r \geq 0,999$

b) Einfluß der OH-Konzentration auf die maximale Extinktion (481 nm) der Jaffé-Reaktion (Kreatinin: 31,25 µmol/l; Pikrat: 4,5 mmol/l)

c) Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten (481 nm) einer Pikratlösung (4,5 mmol/l Pikrat) von der OH^--Konzentration
$y = 0,000134\ x + 0,158$; $r \geq 0,999$

d) Abhängigkeit der initialen Reaktionsgeschwindigkeit der Jaffé-Reaktion von der OH^--Konzentration. (Kreatinin: 31,25 µmol/l; Pikrat: 4,5 und 37,5 mmol/l)
4,5 mmol/l Pikrat: $y = 0,0424\ x + 0,132$ (d_1);
37,5 mmol/l Pikrat: $y = 0,242\ x + 0,398$ (d_2);

Reaktions- und Meßtemperatur bei a) - d) : 35°C

wurde diese Beziehung bei 4,5 mmol/l Pikrat bis 300 mmol/l NaOH gefunden - eine lineare Beziehung besteht, weist auf die Bedeutung von 1-Hydroxy-Pikrat für die Jaffé-Reaktion hin.

5.3.1.3.2. Extinktionskoeffizient

Der Extinktionskoeffizient der Jaffé-Reaktion erreicht nur in einem sehr engen NaOH-Konzentrationsbereich ein Maximum (Abb. 18). Die untere Grenze des sog. "OH^--Konzentrationsoptimums" wird dabei auch von der Pikratkonzentration beeinflußt. Bei 4,5 mmol/l Pikrat liegt das Extinktionsmaximum im Bereich zwischen 73,5 und 90 mmol/l NaOH (Abb. 18). Bei 37,5 mmol/l Pikrat wird das Extinktionsmaximum der Jaffé-Reaktion bereits bei einer NaOH-Konzentration von 25 mmol/l erreicht.

Die Extinktion der Jaffé-Reaktion im Bereich der "Jaffé-Bande" ist nach Abzug des Pikrat-Untergrundes Ausdruck für die Absolutkonzentration des Jaffé-Adduktes im Meßansatz. Die Beziehung zwischen der Größe des Extinktionskoeffizienten und der NaOH-Konzentration beruht neben dem o.g. Einfluß der Basenkonzentration auf die Bildungsgeschwindigkeit auf folgenden Faktoren:

a) Zunehmende Anlagerung von OH^- an das unsubstituierte Ring-C-Atom des Jaffé-Adduktes bei steigender Basenkonzentration unter Bildung von 3-Kreatininat-5-Hydroxy-Pikrat. Hinweis hierauf ist die lineare Beziehung zwischen Abnahme der Absorptionsintensität der "Jaffé-Bande" und Anstieg der OH^--Konzentration (Abb. 18). Die Diadduktbildung ist mit einer Abnahme der Absorption im Bereich der "Jaffé-Bande" verbunden.

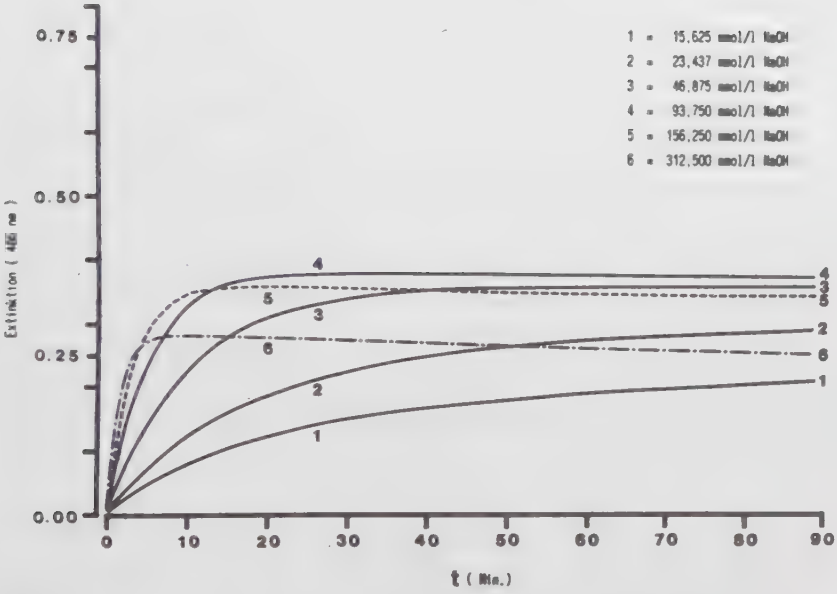


Abb. 19: Einfluß der OH^--Konzentration auf den Extinktionskoeffizienten (486 nm) und auf den zeitlichen Ablauf der Jaffé-Reaktion (Kreatinin: 31,25 µmol/l; Pikrat: 4,5 mmol/l;) Referenz: H_2O/Pikrat/NaOH; T:35°C

b) Vermehrte Bildung von 3-Hydroxy-Pikrat und 3,5-Dihydroxy-Pikrat bei steigender NaOH-Konzentration. Bei Anlagerung von Kreatininat an C-5 des 3-Hydroxy-Pikrates entstehen direkt stabile Propenid-Komplexe.

c) Zunahme der Hydrolyse des Kreatinins. Da die Umsetzung von Kreatinin mit Pikrat im alkalischen Milieu quantitativ nicht vollständig ist - es stellt sich ein Reaktionsgleichgewicht ein -,

wirkt sich eine verstärkte Hydrolyse des Kreatinins indirekt auf die Absolutkonzentration des Jaffé-Adduktes und damit auf den Extinktionskoeffizienten der Jaffé-Reaktion aus.

5.3.1.3.3. Konstanz des Extinktionsmaximums

Nach Erreichen der maximalen Extinktion kommt es - je nach OH^--Konzentration - mehr oder minder rasch wieder zu einer Extinktionsabnahme (Abb. 19). Die Dauer der maximalen Extinktion nimmt mit steigender NaOH-Konzentration ab, da die Geschwindigkeit der Weiterreaktion mit der Basenkonzentration zunimmt. Die Zeitspannen, in denen bei verschiedenen OH^--Konzentrationen eine weitgehende Konstanz des Extinktionsmaximums beobachtet werden kann, sind in Tab. VIII zusammengefaßt.

NaOH (mmol/l)	Zeit (Min.)	NaOH (mmol/l)	Zeit (Min.)
42,5	46	105,0	16
58,0	33	120,5	12
73,5	26	152,0	10
89,5	20		

Tab. VIII: Einfluß der OH^--Konzentration des Milieus auf die Dauer der Konstanz des Extinktionsmaximums der Jaffé-Reaktion

5.3.1.4. Der optimale NaOH-Konzentrationsbereich

In dem sog. optimalen NaOH-Konzentrationsbereich liegt im Reaktionsansatz ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Bildung und Zerfall sowie Weiterreaktion des Jaffé-Adduktes vor. Unter Berücksichtigung der Forderung, daß die NaOH-Konzentration so gewählt werden soll, daß einerseits bei der Jaffé-Reaktion ein maximaler Extinktionskoeffizient erhalten wird, andererseits die Extinktion des Hydroxy-Pikrat-Untergrundes nicht zu stark ansteigt und weiterhin die Dauer der Farbkonstanz des Extinktionsmaximums ausreichend lang ist, sollte bei 4,5 bis 6,25 mmol/l Pikrat die Konzentration der freien NaOH im Reaktionsansatz ca. 73 bis 90 mmol/l betragen. Bei diesen Werten ist zu beachten, daß Pikrat- und NaOH-Konzentration miteinander in Beziehung stehen, wobei eine Erhöhung der Pikrat-Konzentration innerhalb gewisser Grenzen eine Reduzierung der Basenkonzentration ermöglicht.

5.3.2. Die Pikrat-Konzentration

Die Wahl der Pikrat-Konzentration ist für die Jaffé-Reaktion in zweifacher Hinsicht von Bedeutung. Einerseits ist Pikrat der Reaktionspartner des Kreatinins, andererseits ist die Extinktion von Pikrat und besonders Hydroxy-Pikrat bei Messung im Einstrahlverfahren bzw. gegen Wasser ein Teil der Gesamtextinktion und beeinflußt damit die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Methode.

Bei den Verfahren, die zur Präzisierung der Kreatininbestimmung mit alkalischer Pikratlösung durch Optimierung der Reaktionsbedingungen entwickelt wurden, werden Pikrat-Konzentrationen von 2,3 (13) bis 67 mmol/l (85) empfohlen. Von den meisten Autoren wird eine Pikrat-Konzentration zwischen 5 und 17 mmol/l für die Bestimmungen angegeben.

Untersuchungen von BONSNES & TAUSSKY [1945] (41) sowie später von BIGGS & COOPER [1961] (29), KOISHI [1962] (172) und in neuerer Zeit von COOK [1975] (75) hatten ergeben, daß durch Erhöhung der Pikrat-Konzentration bis zu 5 mmol /l (75) bzw. 5,7 mmol/l (29) und 7,75 mmol/l (172) die Extinktion des Jaffé-Reaktionsansatzes größer wird. Bei weiterer Erhöhung der Pikrat-Konzentration konnte bei gleichbleibender Basenkonzentration keine Änderung des Extinktionskoeffizienten der Jaffé-Reaktion mehr beobachtet werden.

Untersuchungen über die Beziehung zwischen Pikrat-Konzentration und Reaktionsgeschwindigkeit (11, 12, 70, 75, 134, 189) ergaben, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Jaffé-Reaktion mit steigender Pikrat-Konzentration zunimmt; BARTELS & CIKES (11) fanden einen linearen Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und der Pikrat-Konzentration.

5.3.2.1. Versuchsdurchführung

Meßansatz: 0,2 ml Kreatinin (0,5 mmol/l) + 2 ml Pikrat (1 - 60 mmol/l) + 1 ml NaOH (350 mmol/l);
Reaktionstemperatur: 35°C; Messung gegen H_2O sowie gegen H_2O/Pikrat/NaOH; Schichtdicke: 10 mm
Wellenlänge: 498 nm ; - Diese Wellenlänge wurde gewählt, da bei Pikratkonzentrationen über 20 mmol/l die Absorption bei 485 nm den Meßbereich des Gerätes überschreitet. - Einstellung der Eichlinie für 498 nm mit Filter (gelb-mittel).

5.3.2.2. Das Pikrat-Spektrum zwischen 480 und 500 nm

Ein Anstieg der Pikrat-Konzentration ist durch die Verbreiterung der Pikratbande, die zu einer bathochromen Verschiebung der Flanke im längerwelligen Bereich führt, mit einer starken Zunahme der Pikratabsorption im Wellenlängenbereich zwischen 480 und 500 nm verbunden (Abb. 20). Bei einer Meßtemperatur von 35°C beträgt der Extinktionskoeffizient einer wässrigen Pikratlösung bei 585 nm: $1,133 \cdot 10^5$ ($cm^2 mol^{-1}$), bei 490 nm: $5,844 \cdot 10^4$ ($cm^2 mol^{-1}$) und bei 500 nm : $1,76 \cdot 10^4$ ($cm^2 mol^{-1}$).

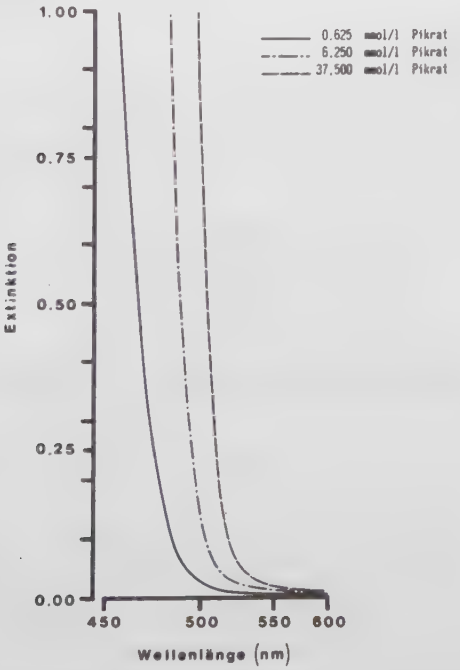


Abb. 20: Einfluß der Pikratkonz. auf den Verlauf des Absorptionsspektrums einer wässrigen Pikratlösung im Bereich zwischen 450 und 600 nm. (T: 35°C; Schichtdicke: 10 mm; Referenz: H_2O)

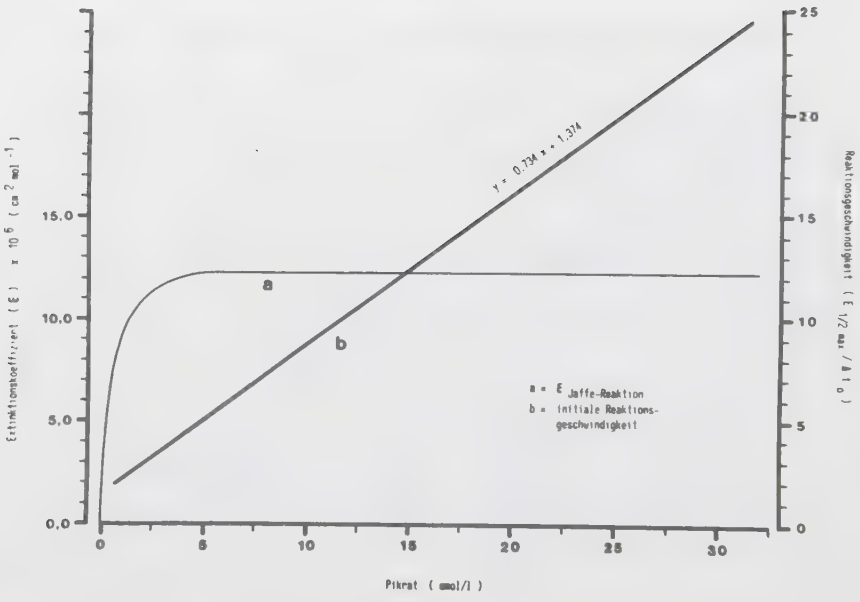


Abb. 21: Einfluß der Pikratkonzentration auf die Jaffé-Reaktion
a) maximale Extinktion (498 nm)
b) Abhängigkeit der initialen Reaktionsgeschwindigkeit von der Pikratkonzentration
($y = 0,734\ x + 1,374$; $r = 0,999$)

Reaktionsbedingungen für a) und b) : Kreatinin: 31,25 µmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l; T: 35°C

5.3.2.3. Einfluß der Pikratkonzentration auf die Jaffé-Reaktion

5.3.2.3.1. Reaktionsgeschwindigkeit

- Zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit s. Abb. 17 -
Eine Erhöhung der Pikratkonzentration (x) ist mit einer Zunahme der initialen Reaktionsgeschwindigkeit (Rg) verbunden (Abb. 21; Abb. 22), wobei für den Konzentrationsbereich von 0,625 bis 37,5 mmol/l Pikrat folgende Beziehung gefunden wurde: $Rg = 0,734\ x + 1,37$; $r = 0,999$.

5.3.2.3.2. Extinktionskoeffizient

Eine Erhöhung der Pikratkonzentration bis maximal 5 mmol/l führt - bei einer NaOH-Konzentration von 109 mmol/l - zu einer Zunahme des Extinktionskoeffizienten des Jaffé-Reaktionsansatzes. Pikratkonzentrationen über 5 mmol/l haben bei den o.a. Reaktionsbedingungen keinen weiteren Einfluß mehr auf die Gesamtmenge des gebildeten Jaffé-Adduktes (Abb. 21; Abb. 22).

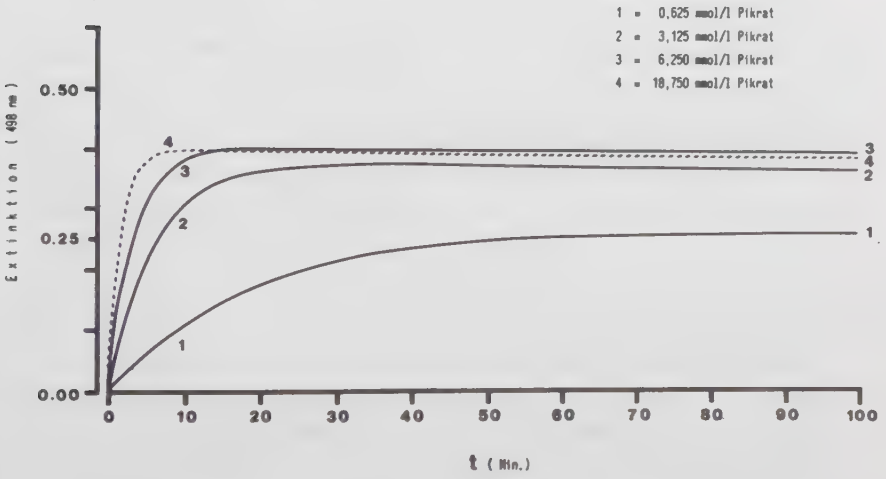


Abb. 22: Einfluß der Pikratkonzentration auf den Extinktionskoeffizienten (498 nm) und auf den zeitlichen Ablauf der Jaffé-Reaktion (Kreatinin: 31,25 µmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l T: 35°C; Referenz: H_2O/Pikrat/NaOH)

5.3.2.3.3. Konstanz des Extinktionsmaximums

Im Konzentrationsbereich zwischen 1,25 und 6,5 mmol/l ist ein Anstieg der Pikratkonzentration mit einer geringen Zunahme der Dauer der maximalen Extinktion verbunden (Abb. 22). Ein weiterer Konzentrationsanstieg beeinflußt dann kaum noch die Zeitspanne, in der das Extinktionsmaximum der Jaffé-Reaktion konstant ist.

5.3.2.4. Die Pikratkonzentration bei der Mikrobestimmung des Kreatinins

Für die Reaktionsgeschwindigkeit und den Extinktionskoeffizienten der Jaffé-Reaktion erweist sich eine Pikratkonzentration von 4,3 bis 5,0 mmol/l im Meßansatz als sehr günstig. Zwar ist eine Reduzierung der Pikratkonzentration von 5,0 auf 4,3 mmol/l mit einer Verminderung des Extinktionskoeffizienten der Jaffé-Reaktion um 3,6 % verbunden, jedoch wird dadurch gleichzeitig eine Senkung der Absorption des Pikratuntergrundes um 12,5 % erreicht. Zur Mikrobestimmung des Kreatinins wird daher von uns eine Pikrat-Konzentration im Meßansatz von 4,5 mmol/l gewählt. Dies führt bei 485 nm zu einer Verminderung des maximalen Extinktionskoeffizienten um 2,6 % bei gleichzeitiger Reduzierung der Pikratabsorption um 10 %.

5.3.3. Die Temperatur

Bei den meisten manuellen Verfahren zur Kreatininbestimmung mit Hydroxy-Pikrat wird auch heute auf eine Temperierung des Reaktionsansatzes verzichtet. Reaktion und Messung werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nachdem PETERS (240) bereits 1942 auf eine mögliche Beeinflussung der Jaffé-Reaktion durch Temperaturänderungen aufmerksam gemacht hatte, forderte HAUGEN 1953 erstmals, daß zur genauen Kreatininbestimmung Standard und Probe bei gleicher Temperatur inkubiert und

gemessen werden müssen (125). KOISHI (1962) fand im Winter bei ca. 25 % der Messungen niedrigere Serumkreatininwerte, als im Sommer (172).

Die Angaben über die Art des Temperatureinflusses auf die Jaffé-Reaktion sind widersprüchlich. Einige Untersucher beobachteten im Bereich zwischen 10 und 30°C bei Temperaturanstieg eine Zunahme des Extinktionskoeffizienten der Farbreaktion (26, 86, 128, 172, 197) von 0,5 bis 1,2 % (26, 172) pro °C. Andere Untersucher (91, 127, 138, 184, 231, 258) beobachteten bei Temperaturänderung lediglich eine reversible Änderung der Absorption von Probe und Leerwert, was auf die temperaturabhängige Änderung der Pikrat-Absorption zurückgeführt wurde. Bei Temperaturänderung um 1°C wurde bei 510 nm eine Absorptionsänderung von 0.02 Absorptionseinheiten gefunden (85). Es konnte jedoch keine eindeutige Temperaturabhängigkeit des Extinktionskoeffizienten des Jaffé-Adduktes nachgewiesen werden (85, 134, 199, 281, 317).

Die Bedeutung der Temperatur wird von vielen Autoren (12, 13, 85, 134, 199, 317) lediglich in der Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit und damit des Meßzeitpunktes (143) und bei den Verfahren ohne vorherige Abtrennung der Chromogene zusätzlich in der Beeinflussung der Chromogeninterferenz gesehen (134) . Bei den meisten Verfahren, die in der letzten Zeit zur Verbesserung der Spezifität der Jaffé-Reaktion entwickelt wurden (12, 13, 14, 34, 74, 85, 93, 134, 199, 248, 319), wird eine sorgfältige Einhaltung der Reaktionstemperatur bei Inkubation und Messung empfohlen. Für die Reaktionstemperatur werden Werte zwischen 20°C (143) und 35°C (134) vorgeschlagen.

Besondere Bedeutung hat die Reaktions- und Meßtemperatur bei den kinetischen Verfahren erhalten. Die Proben werden hier bei Temperaturen zwischen 37°C (14, 85, 248) und 40°C (319) inkubiert und gemessen (s. Kap. 5.3.4.).

5.3.3.1. Versuchsdurchführung

1. Temperatureinfluß auf das Pikratspektrum: Hierzu wurde das Spektrum von Pikrinsäure in wässriger und alkalischer Lösung (Pikrat: 0,625 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l) im Wellenlängenbereich zwischen 330 - 660 nm bei Temperaturen von 15° bis 40°C aufgezeichnet; Schichtdicke: 1 mm; die Messung erfolgte jeweils gegen das Lösungsmittel.

2. Temperatureinfluß auf das Spektrum des Jaffé-Adduktes: Das Spektrum von JA(MeOH), gelöst in H_2O bzw. NaOH (JA(MeOH): 0,465 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l), wurde bei Temperaturen von 10° - 40°C aufgezeichnet. Wellenlängenbereich: 320 - 600 nm; Schichtdicke: 1 mm; Messung jeweils gegen das Lösungsmittel. Zur Beurteilung des Zerfalls wurde die Extinktion 3 Min. sowie 32 Min. nach Lösen des JA bei verschiedenen Temperaturen (10° - 40°C) bei 485 nm bestimmt.

3. Temperatureinfluß auf die Jaffé-Reaktion:
Meßansatz: 0,2 ml Kreatinin (0,5 mmol/l) + 2 ml Pikrat (7,2 mmol/l bzw. 60 mmol/l) + 1 ml NaOH (0,35 mol/l) Temperaturbereich: 20° - 40°C; Messung gegen H_2O sowie gegen H_2O/Pikrat/NaOH
Wellenlänge: 7,2 mmol/l Pikrat: 481 nm; Eichlösung: Kaliumchromat (62,69 mmol/l)
60 mmol/l Pikrat: 496 nm; Einstellung der Eichlinie mit Filter (gelb-mittel)
Bei der Einstellung der Eichlinie wurde die temperaturabhängige Verschiebung der Filterabsorption und der Chromat-Bande beachtet.

5.3.3.2. Temperatureinfluß auf das Pikrat-Spektrum

5.3.3.2.1. Pikrat

Ein Temperaturanstieg bedingt durch Elektronenverschiebung im Pikrat-Ion sowie durch Änderung der Solvatisierung eine bathochrome Verschiebung des Pikrat-Spektrums (Abb. 23A). Das Maximum der Pikrat-Bande wird bei einer Temperaturzunahme von 10°C um 3 nm in den längerwelligen Bereich hin verschoben. Da das Pikrat-Spektrum zwischen 480 und 540 nm in Form einer Flanke verläuft (Abb. 23A), ist in diesem Abschnitt ein Temperaturanstieg bei konstanter Wellenlänge mit einer - je nach Pikratkonzentration - mehr oder minder starken Extinktionszunahme verbunden. Bei 4,5 mmol/l Pikrat wird zwischen 20 und 35°C bei 481 nm eine Extinktionsänderung von 2,6 % (20°C) bis 2 % (35°C) bei Temperaturänderung um 1°C gefunden. Mit Zunahme der Pikratkonzentration wird die temperaturbedingte Extinktinktionsänderung aufgrund des steileren Bandenverlaufes größer und beträgt bei 37,5 mmol/l Pikrat im Bereich zwischen 20 und 35°C bei 496 nm bereits 3 % (20°C) bis 2,3 % (35°C) pro °C. Zwischen der Extinktion (y) und der Temperatur (x) besteht bei konstanter Wellenlänge eine lineare Beziehung. Je nach Pikratkonzentration und Wellenlänge wurden für den Bereich zwischen 20°C und 40°C folgende Gleichungen gefunden:

a) Pikrat: 4,5 mmol/l; 481 nm:
$y = 0,012\ x + 0,249;\ r \geq 0,999$

b) Pikrat: 37,5 mmol/l; 496 nm:
$y = 0,021\ x + 0,287;\ r \geq 0,999$

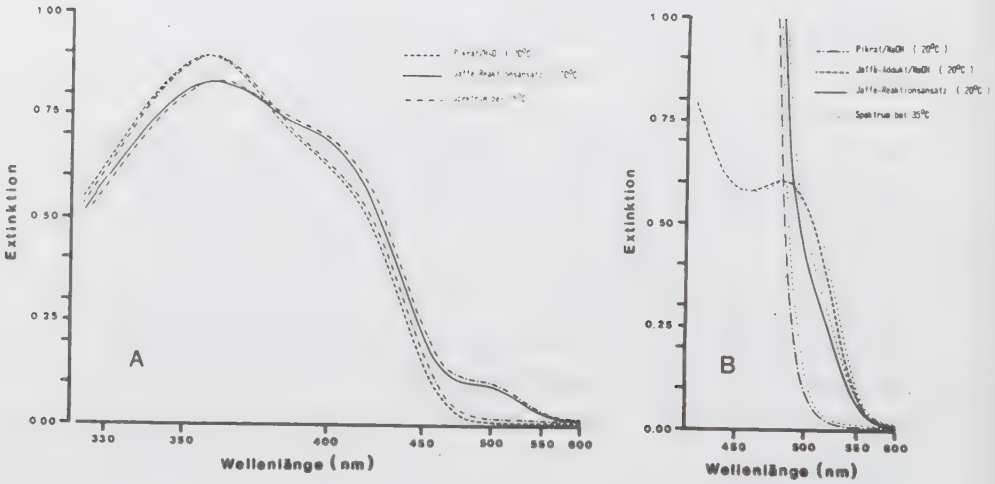


Abb. 23: Einfluß der Temperatur auf das Absorptionsspektrum (Temperatur: 20° und 35°C; Referenz: H_2O)

A: wässrige Pikratlösung (Pikrat: 625 µmol/l)
Jaffé-Reaktionsansatz (Kreatinin: 62,5 µmol/l; Pikrat: 625 µmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l)
Schichtdicke: 1 mm

B: alkalische Pikratlösung (Pikrat: 4,5 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l)
Jaffé-Addukt in NaOH (JA (MeOH): 46,5 µmol/l; NaOH: 109, 375 mmol/l)
Jaffé-Reaktionsansatz (Kreatinin: 31,25 µmol/l; Pikrat: 4,5 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l)
Schichtdicke: 10 mm

5.3.3.2.2. Hydroxy-Pikrat

Das Absorptionsspektrum einer wässrigen, alkalischen Pikratlösung zeigt in seinem Verlauf die gleiche Temperaturabhängigkeit wie das Spektrum einer wässrigen Pikratlösung (Abb. 23B). Für die Abhängigkeit der Extinktion (y) der Hydroxy-Pikratlösung (Pikrat: 4,5 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l) von der Temperatur (x) findet sich bei 481 nm für den Bereich zwischen 20^{o} und 40^{o}C folgende Beziehung:

$y = 0,012\ x + 0,309;\ r = 0,999$

Berücksichtigt man bei der Messung die temperaturabhängige Bandenverschiebung, so wird der Extinktionskoeffizient der einzelnen Punkte des Spektrums von Hydroxy-Pikrat im sichtbaren Bereich nicht durch Temperaturschwankungen beeinflußt.

5.3.3.3. Temperatureinfluß auf das Jaffé-Addukt

5.3.3.3.1. Absorptionsspektrum

Sowohl in wässriger, neutraler, wie auch in alkalischer Lösung zeigen beide Banden des Jaffé-Adduktes eine ähnliche Abhängigkeit von der Temperatur wie das Pikratspektrum. Eine Temperaturzunahme um 10^{o}C führt auch hier zu einer Verschiebung des Spektrums um ca. 3 nm in den längerwelligen Bereich hin (Abb. 23B). Die Extinktionskoeffizienten der Maxima der beiden Banden werden im Bereich zwischen 20 und 40^{o}C nicht durch Temperaturschwankungen beeinflußt.

5.3.3.3.2. Stabilität des Jaffé-Adduktes

- Die Charakterisierung der Zerfallsgeschwindigkeit erfolgte durch das Extinktionsverhältnis E_{t2}/E_{t1} wie in Kapitel 5.3.1.2.3. beschrieben (s. auch Abb. 24) -

Eine Temperaturerhöhung bewirkt eine Zunahme der Zerfallsgeschwindigkeit, deren Ausmaß von dem pH der Lösung abhängig ist (Abb. 24). In wässriger, neutraler Lösung nimmt die Zerfallsgeschwindigkeit bei Temperaturerhöhung von 20° auf 35°C um 43 % (2,85 %/°C) zu, in alkalischer Lösung (109 mmol/l NaOH) nur ca. 29 % (1,92 %/°C). Zwischen 10° und 20°C finden sich für die Stabilität des Jaffé-Adduktes etwas günstigere Verhältnisse. Bei Temperaturerhöhung von 10° auf 20°C läuft der Zerfall des Jaffé-Adduktes in wässriger, neutraler Lösung nur 5,8 % (0,58 %/°C) rascher ab (Abb. 24).

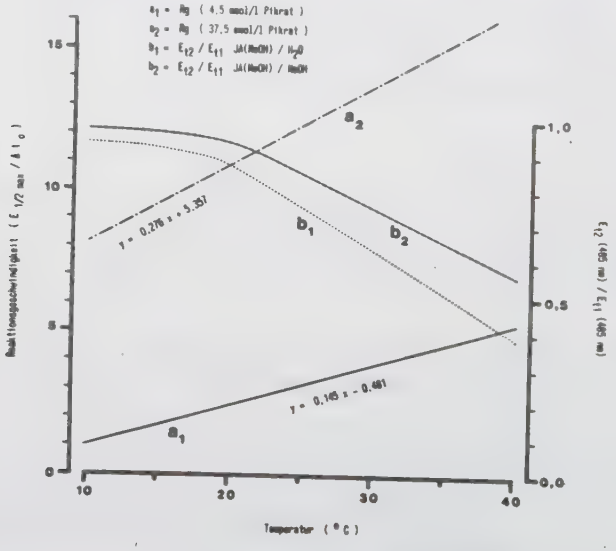


Abb. 24: Einfluß der Temperatur auf die Jaffé-Reaktion

a) Abhängigkeit der initialen Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur (Kreatinin: 31,25 µmol/l; Pikrat: 4,5 und 37,5 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l)
4,5 mmol/l Pikrat: $y = 0,145\ x - 0,481$ (a_1);
37,5 mmol/l Pikrat: $y = 0,276\ x + 5,357$ (a_2).

b) Einfluß der Temperatur auf die "Stabilität" des Jaffé-Adduktes in wässriger und alkal. Lösung (Erl. s. Abb.: 16) (t_1 = 3 Min.; t_2 = 32 Min. nach Lösen von JA (MeOH) (0,465 mmol/l) in H_2O (b_1) bzw. in NaOH (109,375 mmol/l) (b_2)).

5.3.3.4. Temperatureinfluß auf die Jaffé-Reaktion

5.3.3.4.1. Extinktionskoeffizient

Für die Jaffé-Reaktion mit einem wässrigen Kreatininstandard findet sich bei 0,03125 mmol/l Kreatinin sowie einer Pikratkonzentration von 4,5 mmol/l und einer NaOH-Konzentration von 109,375 mmol/l folgende Beziehung zwischen der Gesamtextinktion des Meßansatzes (y) und der Temperatur (x) bei 481 nm: $y = 0,012\ x + 0,69$; $r \geq 0,999$

Der Anstieg der Regressionsgeraden entspricht dem Anstieg der Geraden, die sowohl in wässriger, wie auch in alkalischer Pikratlösung für die Beziehung zwischen Temperatur und Extinktionskoeffizient bei dieser Wellenlänge gefunden wurde. Dies weist darauf hin, daß die temperaturabhängige Veränderung der Gesamtextinktion auch im Jaffé-Reaktionsansatz nur auf die temperaturabhängige Verschiebung der Spektren von Pikrat, Hydroxy-Pikrat und des Jaffé-Adduktes zurückzuführen ist (Abb. 23).

5.3.3.4.2. Reaktionsgeschwindigkeit

Das Ausmaß, in dem die Reaktionsgeschwindigkeit bei Temperaturanstieg zunimmt, ist von der Ausgangstemperatur und dem Verhältnis der Reaktionspartner zueinander abhängig. Bei einer Pikratkonzentration von 4,5 mmol/l, einer NaOH-Konzentration von 109,375 mmol/l sowie einer Kreatininkonzentration von 0,03125 mmol/l nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit - Maß für die initiale Reaktionsgeschwindigkeit ist $E_{1/2\ max} / \Delta t_o$ (s. Abb. 17) - bei Temperaturerhöhung um $1^{\circ}C$ ca. 5,9 % bei $20^{\circ}C$ und ca. 3,7 % bei $35^{\circ}C$ zu.

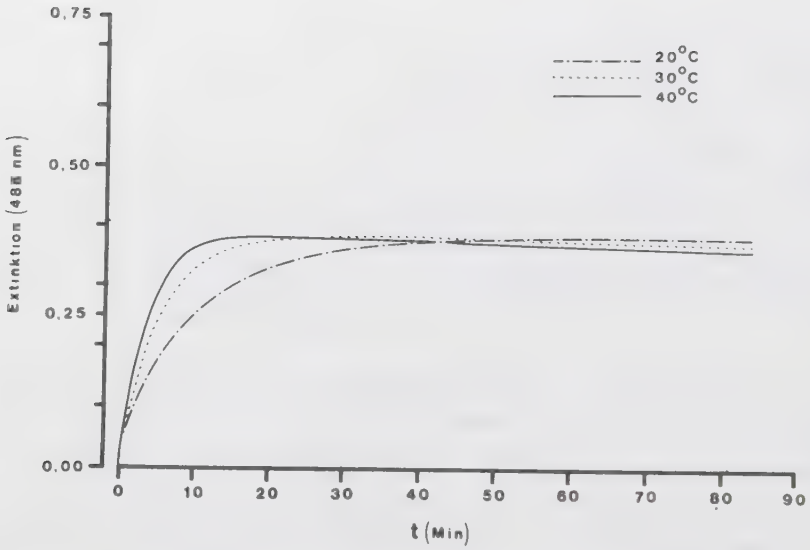


Abb. 25: Einfluß der Temperatur auf den Extinktionskoeffizienten (486 nm) und auf den zeitlichen Ablauf der Jaffé-Reaktion
(Kreatinin: 31,25 µmol/l; Pikrat: 4,5 mmol/l;
NaOH: 109,375 mmol/l)
Referenz: H_2O/Pikrat/NaOH

Bei einer Pikratkonzentration von 37,5 mmol/l, bei der die Jaffé-Reaktion wesentlich rascher abläuft, wird die Umsetzungsgeschwindigkeit durch Temperaturerhöhung bei 20°C nur noch um 2,5 %/°C und bei 35°C um ca. 2 %/°C gesteigert.

Für die Abhängigkeit der initialen Reaktionsgeschwindigkeit (Rg) in einem Meßansatz mit wässrigem Kreatininstandard (Kreatinin: 31,25 µmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l) von der Temperatur (x) wurde je nach Pikratkonzentration folgende Beziehung gefunden:

4,5 mmol/l Pikrat: $Rg = 0,145\,x - 0,481$; $r \geq 0,999$

37,5 mmol/l Pikrat: $Rg = 0,276\,x + 5,357$; $r \geq 0,999$

5.3.3.4.3. Konstanz des Extinktionsmaximums

Mit steigender Temperatur laufen sowohl Zerfall wie auch Weiterreaktion des Jaffé-Adduktes zunehmend rascher ab, so daß bei Temperaturanstieg im Meßansatz die Konstanz des Extinktionsmaximums der Jaffé-Reaktion abnimmt (Abb. 25). Die Beziehung zwischen der Zeitspanne, in der das Extinktionsmaximum konstant ist, und der Reaktionstemperatur ist aus Tab. IX zu ersehen.

Temperatur (^{o}C)	Zeit (Min.)
20	55
25	37
30	22
35	17
40	14

Tab. IX: Einfluß der Reaktionstemperatur auf die Dauer der Konstanz des Extinktionsmaximums

5.3.3.5. Die Reaktions- und Meßtemperatur bei der Mikrobestimmung

Der Extinktionskoeffizient der Jaffé-Reaktion ist im Bereich zwischen 20^{o} und 40^{o}C von der Temperatur unabhängig, wenn der Temperatureinfluß auf die Lage der "Jaffé-Bande" und auf die Reaktionsgeschwindigkeit ausreichend berücksichtigt wird. Bei Messung gegen H_2O oder bei Messungen im Einstrahlverfahren wird jedoch die Gesamtextinktion des Meßansatzes aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Lage der Spektren von Pikrat, Hydroxy-Pikrat und des Jaffé-Adduktes sehr

stark durch die Meßtemperatur beeinflußt. Daher ergeben sich für eine gut reproduzierbare und genaue Kreatininbestimmung mit der Jaffé-Reaktion - besonders für Verfahren, bei denen die Messung nicht gegen den Leerwert erfolgt- hinsichtlich der Temperatur folgende Grundbedingungen:

1. die Reagenzien, die für die Reaktion verwendet werden, sollten vortemperiert sein;
2. Reaktions- und Meßtemperatur von Standard und Probe müssen identisch sein;
3. innerhalb einer Meßreihe sind nur Messungen verwertbar, die bei gleicher Temperatur durchgeführt werden.

Für die Mikrobestimmung des Kreatinins wird von uns für Reaktion und Messung eine Temperatur von 25°C gewählt, da im Bereich zwischen 20°C und 25°C:

1. die Zeit bis zum Erreichen des Extinktionsmaximums innerhalb tolerabler Grenzen liegt. Das Extinktionsmaximum wird bei einer Pikratkonzentration von 4,5 mmol/l, einer NaOH-Konzentration von 109,375 mmol/l und 0,03125 mmol/l Kreatinin bei 25°C nach 36 Min. und bei 20°C nach 50 Min. erreicht.
2. die Konstanz der maximalen Extinktion ausreichend lang ist;
3. der Anteil der Pikratabsorption an der Gesamtextinktion sehr gering ist.

5.3.4. Die Kreatinin-Konzentration

Anfangs war lediglich die Beziehung zwischen Kreatinin-Konzentration und Extinktion der Jaffé-Reaktion Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Mit der Entwicklung der kinetischen Verfahren fand jedoch in letzter Zeit auch der Einfluß der Kreatinin-Konzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Jaffé-Reaktion mehr Beachtung (11, 12, 13, 14, 23, 34, 74, 75, 85, 93, 128, 134, 188, 189, 199, 319). Allgemein wurde in

der Anfangsphase der Jaffé-Reaktion - 6 Minuten (134) bis 10 Minuten (13, 34, 128) nach Start der Reaktion - eine lineare Beziehung zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit, charakterisiert durch die Extinktionsänderung in einem konstanten Meßintervall, und der Kreatininkonzentration beobachtet, wobei als obere Grenze hierfür Werte zwischen 0,105 mmol/l (199) und 0,176 mmol/l (23, 74), bzw. 0,193 mmol/l (319) angegeben werden. Diese Beziehung wird als Hinweis dafür angesehen, daß die Umsetzung von Kreatinin mit Pikrat im alkalischen Milieu als Kinetik I. Ordnung abläuft (11, 14, 270).

5.3.4.1. Versuchsdurchführung

Meßansatz: 0,2 ml Kreatinin (0,1 - 6 mmol/l) + 2 ml HPi (7,2 mmol/l) + 1 ml NaOH (0,35 mol/l);
Reaktionstemperatur: 35°C; Messung gegen H_2O sowie gegen den Leerwert (H_2O/HPi/NaOH).
Die Schichtdicke richtete sich nach der Kreatinin-Ausgangskonzentration. Sie betrug bis 1,5 mmol/l Kreatinin 10 mm. Über 1,5 mmol/l Kreatinin wurde mit einer Schichtdicke von 1 mm gemessen.
Wellenlänge: a) Messung gegen H_2O: 481 nm; Eichlösung: Kaliumchromat (62,69 mmol/l)

b) Messung gegen den Leerwert: hier wurde wegen der starken Absorption der Pikratbande bei 481 nm die Extinktionsbestimmung bei 486 nm durchgeführt; Eichlösung: Kaliumchromat (62,69 mmol/l).

5.3.4.2. Einfluß der Kreatininkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit (Abb. 27)

Aufgrund kinetischer Überlegungen ist zu erwarten, daß der Einfluß von Kreatininat und Pikrat auf die initiale Reaktionsgeschwindigkeit gleich ist. Zwischen der Kreatininkonzentration (x) und der initialen Reaktionsgeschwindigkeit (Rg) wurde folgende Beziehung gefunden (Abb. 27):

$Rg = 145,74\ x - 0,1002;\ r \geq 0,999$

Diese Beziehung gilt bei den hier gewählten Reaktionsbedingungen bis zu einer Kreatininkonzentration im Meßansatz von 255 µmol/l. Die nahezu identischen Werte für die Bildungskonstante (32.38 und 35.58), die sich aus den kinetischen Messungen mit Variation der Pikrat- bzw. Kreatininkonzentration ergeben (Abb. 21; Abb. 27), sind eine Bestätigung für den postulierten Reaktionsmechanismus (Kap. 4.2.2.), daß sich Kreatininat an Pikrat anlagert.

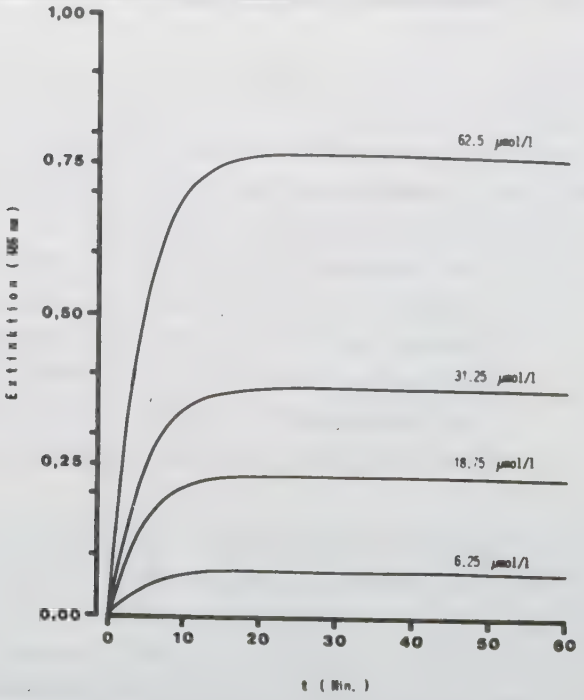


Abb. 26: Einfluß der Kreatininkonzentration auf die Extinktion (486 nm) und den zeitlichen Ablauf der Jaffé-Reaktion (Pikrat: 4,5 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l; T: 35°C; Schichtdicke: 10 mm)
Referenz: H_2O/Pikrat/NaOH

Bei höherer Kreatininkonzentration wird dE/dt geringer (Abb. 27). Ursache hierfür ist die vermehrte Bildung von 3,5-Dikreatininat-Pikrat, die mit steigender Kreatininkonzentration zunimmt (s. Kap. 4.2.3.). Dies ist auch die Ursache für die allmähliche Abnahme der Konstanz des Extinktionsmaximums, die bei den hier gewählten Reaktionsbedingungen dann zu beobachten ist, wenn das Kreatinin/Pikrat-Verhältnis von 1 : 150 unterschritten wird (Abb. 26). Bei einem Kreatinin/Pikrat-Verhältnis von 1 : 15 verkürzt sich der Zeitraum, in dem die maximale Extinktion gemessen werden kann, um ca. 65 %.

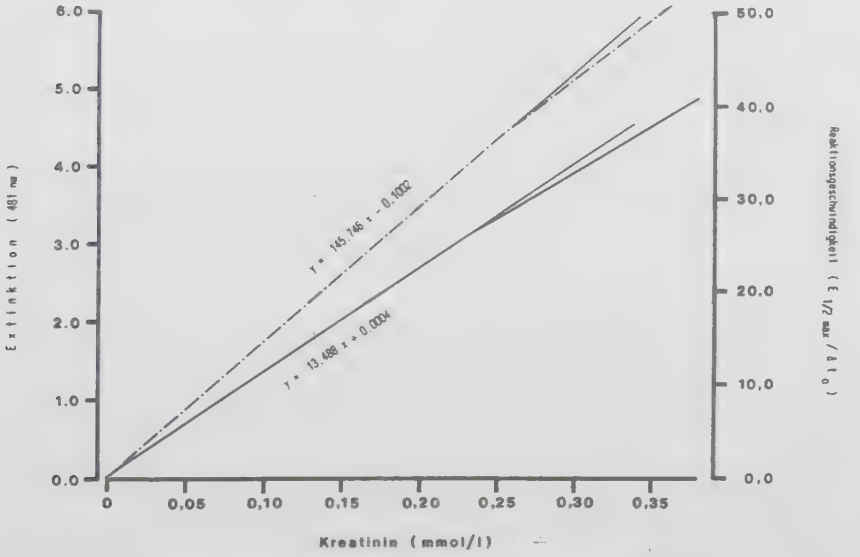


Abb. 27: a) Die Beziehung zwischen der maximalen Extinktion (481 nm) der Jaffé-Reaktion und der Kreatininkonzentration ($y = 13,488x + 0,00042$; $r \geq 0,999$) Schichtdicke: 10 mm

b) Einfluß der Kreatininkonzentration auf die initiale Reaktionsgeschwindigkeit der Jaffé-Reaktion ($y = 145,746x - 0,1002$; $r \geq 0,999$)

Reaktionsbedingungen für a) und b): Pikrat: 4,5 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l; T: 35°C - Die Beziehung gilt bei a) bis 235 und bei b) bis 255 µmol/l Kreatinin -

5.3.4.3. Die Beziehung zwischen der Extinktion der Jaffé-Reaktion und der Kreatininkonzentration

5.3.4.3.1. Extinktionskoeffizient

Im Bereich des Extinktionsmaximums konnte bei den hier gewählten Reaktionsbedingungen zwischen der Kreatinin-Konzentration (x) und der Extinktion (y) bei 481 nm eine lineare Beziehung bis zu einer Kreatininkonzentration von 235 µmol/l gefunden werden (Abb. 27). Für die Regressionsgerade fand sich bei einer Pikratkonzentration im Reaktionsansatz von 4,5 mmol/l, einer NaOH-Konzentration von 109,375 mmol/l und einer Reaktionstemperatur von 35°C folgende Gleichung:

$y = 13,48\ x + 0,00042;\ r \geq 0,999$

Der Extinktionskoeffizient (ε_{481}) der Jaffé-Reaktion beträgt bei 481 nm und den oben genannten Reaktionsbedingungen $1,348 \cdot 10^7$ ($cm^2 mol^{-1}$).

Der Vergleich zwischen dem Extinktionskoeffizienten des isolierten Jaffé-Adduktes bei 481 nm ($\varepsilon_{481} = 1,365 \cdot 10^7$ ($cm^2 mol^{-1}$)) und dem für den Reaktionsansatz der Jaffé-Reaktion gefundenen maximalen Extinktionskoeffizienten zeigt, daß zum Zeitpunkt der maximalen Absorption unter den hier gewählten Reaktionsbedingungen ca. 98,6 % des Kreatinins mit Pikrat einen roten Farbkomplex bilden.

5.3.4.3.2. Das Lambert-Beer'sche Gesetz

Die Grundvoraussetzung für die Verwendung einer Farbreaktion zur photometrischen Konzentrationsbestimmung besteht darin, daß die Farbkonzentration der Konzentration der zu untersuchenden Substanz direkt proportional ist und daß für das Verhältnis zwischen der Konzentration des entstehenden Farbkomplexes und der Lichtabsorption das Beer'sche Gesetz gilt, d.h. die Beziehung

$$\log \frac{I_o}{I} = c \cdot d \cdot \varepsilon .$$

Wie aus vielen Untersuchungen hervorgeht (26, 45, 69, 70, 75, 85, 86, 91, 101, 132, 138, 143, 163, 164, 172, 184, 197, 202, 217, 219, 231, 248, 262, 266, 317), wird diese Grundvoraussetzung bei der Jaffé-Reaktion bis zu einer Kreatininkonzentration von 0,1 bis 0,22 mmol/l - die Angaben schwanken je nach Autor - weitgehend erfüllt. Lediglich CLARKE (70) gab an, daß die Beziehung zwischen Kreatininkonzentration und Extinktion bei 490 nm einer Exponentialfunktion entspricht. Einige Untersucher (101, 143, 231, 248, 266) beobachteten, daß die obere Grenze für die Kreatininkonzentration, bei der noch eine Proportionalität zwischen Konzentration und Extinktion besteht, in der Nähe des Absorptionsmaximums des Jaffé-Adduktes bereits bei geringerer Kreatininkonzentration erreicht wird als im Bereich längerer Wellenlängen.

Unter den hier gewählten Reaktionsbedingungen ist die Kreatinin-Konzentration der Extinktion der Jaffé-Reaktion bei 481 nm bis zu einem Wert von 235 µmol/l direkt proportional (s.o.). Höhere Kreatinin-Konzentrationen führen zu einer negativen Abweichung der Eichgeraden, d.h. $dE/d[Kr]$ wird geringer (Abb. 27). Die Abweichung vom Beer'schen Gesetz und die Einschränkung der linearen Beziehung zwischen Kreatinin-Konzentration und initialer Reaktionsgeschwindigkeit der Jaffé-Reaktion beginnen bei annähernd ähnlicher Kreatinin-Konzentration. Bei 0,375 mmol/l Kreatinin beträgt die Abweichung der gemessenen Extinktion von dem aus der Regressionsgeraden rechnerisch ermittelten Wert ca. 3,5 %.

Ein fast identischer Wert (3,3 %) wurde bei dieser Kreatininkonzentration für die Abweichung der für die Reaktionsgeschwindigkeit gefundenen Größe von dem aus der Regressionsgeraden (s. Kap. 5.3.4.2.) ermittelten theoretischen Wert gefunden. Die Abweichung vom Beer'schen Gesetz ist ähnlich wie die Einschränkung der linearen Beziehung zwischen Kreatininkonzentration und initialer Reaktionsgeschwindigkeit auf die Bildung des in diesem Wellenlängenbereich schwächer absorbierenden 3,5-Dikreatininat-Pikrat zurückzuführen, die mit steigender Kreatininkonzentration zunehmend einsetzt (s. Kap. 4.2.3.).

Auf das Überwiegen der Diaddukt-Bildung bei höherer Kreatininkonzentration weist folgende Beobachtung hin: In einem Reaktionsansatz mit Hydroxy-Pikrat, in dem die Kreatininkonzentration das 2,5-fache der Pikratkonzentration beträgt, tritt unmittelbar nach Kreatinin-Zugabe eine Verbindung mit dem typischen Absorptionsspektrum des Jaffé-Adduktes auf, jedoch setzt dann rasch eine Weiterreaktion unter Rückbildung der Jaffé-Bande ein, wobei das Endprodukt lediglich noch eine Bande im sichtbaren Bereich mit Maximum bei 392 nm aufweist. Eine anschließende Erhöhung der Pikratkonzentration ist mit einer erneuten, jedoch schwächeren Ausbildung der Jaffé-Bande verbunden.

Die unterschiedlichen Angaben über die obere Grenze der linearen Beziehung zwischen Kreatininkonzentration und Extinktion (s.o.) beruhen z.T. darauf, daß die Untersuchungen bei unterschiedlichen Wellenlängen durchgeführt wurden. Die Abweichung vom Beer'schen Gesetz wird um so später signifikant, je weiter die für die Messung gewählte Wellenlänge von dem Absorptionsmaximum des Jaffé-Adduktes entfernt liegt.

6. DIE "JAFFÉ-CHROMOGENE"

6.1. DIE REAKTION DER WICHTIGSTEN "JAFFÉ-CHROMOGENE" MIT ALKALISCHER PIKRATLÖSUNG

6.1.1. Jaffé-positive Verbindungen

Ein allgemein bekannter Nachteil der Jaffé-Reaktion ist ihre geringe Spezifität, da zahlreiche, dem Kreatinin strukturell verwandte Verbindungen, Proteine bzw. Protein-Spaltprodukte sowie Ketone und Zucker - allgemein als Pseudo-Kreatinin - oder Jaffé-Chromogene bezeichnet - ebenfalls zu einer Rotfärbung von alkalischer Pikratlösung führen.

Bereits kurz nach Einführung der Jaffé-Reaktion zur Kreatinin-Bestimmung in Serum und Urin wurde beobachtet, daß Acetessigsäure, Aceton (108) und Glucose (139) eine ähnliche Farbreaktion wie Kreatinin hervorrufen. Weitere Untersuchungen (24, 33, 99, 100, 109, 125, 129, 140, 190, 214, 232, 261) ergaben dann, daß noch mehr Substanzen durch Mitreaktion erhöhte Serumkreatininwerte vortäuschen können. Hunter (1928) beschrieb 38 Verbindungen, die in biologischen Flüssigkeiten vorkommen und zu einer positiven Jaffé-Reaktion führen (140). WEISE und TROPP (1928) beobachteten, daß die Rotfärbung einer alkalischen Pikratlösung auch mit aliphatischen und cyclischen Carbonyl-Verbindungen, Säureamiden und -imiden, Estern, Äthylen-Verbindungen, Cyan-, Nitro- und Diazokörpern auftritt (314). Sie unterschieden je nach Reaktionsverhalten kälte- und hitze-positive Chromogene. Die wichtigsten Jaffé-positiven Verbindungen, die im Serum vorkommen, sind in Tab. X zusammengefaßt.

Störsubstanz	Extinktionsverhältnis $\varepsilon_{J.-Reaktion}/\varepsilon_{Chromogen}$	Autoren
Aceton	28 - 1360	Narayanan (1972), Beyermannn (1967), Soldin et al. (1978), Close-Moll (1972), Husdan et al. (1968), Watkins (1967), Kattermann (1967), Seelig & Wüst (1969)
Acetessigsäure	20 - 103	Kammeraat (1978), Soldin et al. (1978), Watkins (1967), Brown et al. (1977), Husdan et al. (1968), Kattermann (1967), Koenst & Freier (1971), Mitchell (1973), Heinegard et al. (1973)
Albumin	1,75 - 28,5	Beyermann (1964), Raabe et al. (1972)
Ascorbinsäure	38 - 624	Narayanan (1972), Brown et al. (1977), Mitchell (1973), Beyermann (1967), Koenst & Freier (1971), Soldin et al. (1978), Heinegard (1973)
Brenztraubensäure	10 - 51	Narayanan (1972), Kammeraat (1978), Soldin et al. (1978), Mitchell (1973), Beyermann (1967), Koenst & Freier (1971), Brown et al. (1977), Heinegard (1973)
Fructose	138 - 583	Narayanan (1972), Beyermann (1967)
Glucose	1500 - 4930	Haury (1972), Husdan et al. (1968), Soldin et al. (1978), Beyermann (1967)
Glucuronsäure	2490	Beyermann (1964)
Glycocyamidin	2,0 - 3,6	Haury (1972), Beyermann (1967), Narayanan (1972)
Harnsäure	961	Beyermann (1967)
Kreatin	282	Soldin et al. (1978)
Oxalessigsäure	35 - 49	Brown et al. (1977), Beyermann (1967), Soldin et al. (1978), Mitchell (1973)
2-Oxoglutarsäure	5,5 - 11,0	Beyermann (1967), Brown et al. (1977), Mitchell (1973), Soldin et al. (1978)

Tab. X: Die wichtigsten Jaffé-positiven Verbindungen des Serums (angegeben ist die obere und untere Grenze der Werte, die bei verschiedenen Reaktionsbedingungen für das Verhältnis $\varepsilon_{JA}/\varepsilon_{Chromogen-Addukt}$ gefunden wurden. Die Reihenfolge der Autoren entspricht dem angegebenen Extinktionsverhältnis)

Der Extinktionskoeffizient der farbigen Molekülkomplexe, die bei der Umsetzung der Jaffé-positiven Verbindungen mit alkalischer Pikratlösung gebildet werden, ist bei allen Störsubstanzen kleiner als der Extinktionskoeffizient des Jaffé-Adduktes (s. Tab. X) (24, 26, 47, 56, 126, 128, 132, 143, 155, 156, 164, 166, 217, 225, 228, 248, 267, 277, 312), wie auch durch eigene Messungen bestätigt werden konnte (Tab. XI). Da ein großer Teil der interferierenden Verbindungen im Serum in geringer Konzentration vorliegt, wird die direkte Kreatininbestimmung mit der Jaffé-Reaktion nur von wenigen Störsubstanzen stärker beeinflußt. Hierzu gehören Glucose aufgrund ihrer Konzentration im Serum, Aceton und Acetessigsäure, deren Konzentrationen unter pathologischen Bedingungen erhöht sein können, sowie Brenztraubensäure, Bilirubin (24, 26, 84, 146, 155, 164, 165, 183, 199, 220, 276, 313, 319) und Hämoglobin (24, 26, 132, 150, 164, 165, 199).

Weiterhin können verschiedene Pharmaka die Kreatininbestimmung stören, und zwar besonders Barbitursäure (24, 26), Ascorbinsäure (24, 26, 47, 56, 75, 132, 134, 163, 164, 166, 173, 174, 199, 225, 275), α-Methyldopa (24, 56, 200), Chlorpromazin-Metaboliten (159), Nitrofuran- (56) und Pyrazol-Derivate (220), sowie Cephalosporine (291 , 313) und einige Testsubstanzen wie Kongorot (24, 26), Bromthalein (24, 26, 217) und Phenolrot (56). Daneben können Proteine (56, 85, 93, 131, 132, 150, 228, 232, 248, 313, 317) und evtl. bei der Enteiweißung mit Säuren auftretende Spaltprodukte (75,231)bei der Jaffé-Reaktion interferieren. Aminosäuren beeinflussen die Extinktion und den Ablauf der Jaffé-Reaktion dagegen nicht (12, 24, 26, 173, 225, 290, 296).

Bei Vergleich der direkten Kreatininbestimmung mit Methoden, bei denen das Kreatinin vor der Bestimmung von den Chromogenen

abgetrennt wurde, fand sich bei physiologischen Serumkreatininwerten ein Chromogenanteil von 10 - 24 % des gemessenen Gesamtkreatinins (4, 24, 25, 26, 85, 123, 164, 189, 202, 210, 215, 217, 219, 231, 249, 258, 262, 286). Weiterhin wurde beobachtet, daß der prozentuale Anteil der Störsubstanzen mit steigenden Serumkreatininwerten abnimmt. Ein Vergleich der direkten Kreatininbestimmung mit der enzymatischen Bestimmung (Creatinin-Amido-Hydrolase) ergab im Normalserum einen mittleren Chromogenanteil von 17,6 % (36), bzw. 20 % (292, 293) bis 30 % (220, 309). Ähnliche Werte wurden mit der Massenspektrometrie nach gaschromatographischer Vortrennung (15 - 19 %) (30) sowie bei der Bestimmung des Serumkreatinins aufgrund seiner UV-Absorption (15 - 20 %) (67, 277) gefunden. Im Urin beträgt der Chromogenanteil unter physiologischen Verhältnissen dagegen nur 1 % bis maximal 5 % des mit der Jaffé-Reaktion gemessenen Gesamtkreatinins (30, 124, 143, 208, 225, 231, 277).

Die Bedeutung der Chromogeninterferenz für die Serumkreatinin-Bestimmung wird unterschiedlich bewertet. Überwiegend wird die Differenz zwischen den durch direkte Bestimmung erhaltenen Werten und den nach Chromogenabtrennung gefundenen Werten ausschließlich auf die Chromogen-Mitreaktion zurückgeführt. Vereinzelt werden jedoch auch methodische Fehler, die bei der Enteiweißung und der anschließenden Farbreaktion auftreten, als Ursache hierfür angesehen (11, 13, 67, 143). Hinweise für diese Annahme ergeben sich einerseits aus der Beobachtung, daß im Urin viele der Jaffé-positiven Verbindungen in weit höherer Konzentration vorliegen als im Serum, der Chromogenanteil bei der Kreatininbestimmung im Urin jedoch kleiner ist als im Serum (11, 13, 143), und zum anderen aus der Tatsache, daß bei der Kreatininbestimmung mit Analyseautomaten, d.h. unter standardisierten Bedingungen und Enteiweißung durch Dialyse, geringere "Chromogenanteile" - 8 % (210) bis 15 % (36) - gefunden werden.

Über die Größe der molaren Extinktionskoeffizienten der farbigen Molekülkomplexe, die von den interferierenden Verbindungen mit Hydroxy-Pikrat gebildet werden, liegen differierende Angaben vor (Tab. X). Dies ist hauptsächlich auf die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen und Meßzeitpunkte zurückzuführen.

Zur Abschätzung, in welchem Ausmaß unter den hier gewählten Reaktionsbedingungen eine Störung der Meßwerte durch Chromogeninterferenz zu erwarten ist, wurde die Umsetzung der wichtigsten interferierenden Verbindungen mit alkalischer Pikratlösung genauer untersucht. Gleichzeitig wird versucht, Rückschlüsse auf die Reaktionsmechanismen zu erhalten, die bei dieser Umsetzung ablaufen.

6.1.2. Versuchsdurchführung

a) Untersuchte Verbindungen: Es wurden jeweils die wässrigen Lösungen folgender Verbindungen untersucht:
Aceton (0,3 - 3 mmol/l); Albumin (Ovalbumin, Merck 24016) (0,3 - 2 mmol/l); L(+)-Ascorbinsäure (6 - 15 mmol/l); D(-)-Fructose (6 - 15 mmol/l); D(+)-Glucose (10 - 40 mmol/l); D-Glucosaminhydrochlorid (30 - 70 mmol/l); D-Glucuronsäure (6 - 15 mmol/l); Glycocyamidin (0,25 - 1 mmol/l); Harnsäure (10 - 20 mmol/l); Hydantoin (6 - 20 mmol/l); ß-Hydroxybuttersäure Natriumsalz (10 - 65 mmol/l); Kreatin (6 - 15 mmol/l); Methyl-Guanidinhydrochlorid (30 - 65 mmol/l); Natrium-Acetacetat (6 - 24 mmol/l); Natriumacetat (6 - 24 mmol/l); Natriumpyruvat (3,5 - 12 mmol/l); Oxalessigsäure (30 - 75 mmol/l); 2-Oxoglutarsäure (6 - 15 mmol/l).
Mit Ausnahme des Albumins wurden stets Verbindungen mit Reinheitsgrad p.A. verwendet. Die untersuchten Säuren wurden in einer äquimolaren Menge NaOH gelöst, so daß der pH der Ausgangslösung jeweils neutral war. Die Hydrochloride wurden durch Lösen in NaOH in die freie Base überführt.

Glycocyamidinhydrochlorid wurde nach KING (162) durch Erhitzen von Glycocyamin mit konz. HCl dargestellt und durch Umkristallisieren in kaltem, wässrigem NH_3 in Glycocyamidin überführt.
Die Darstellung des Natriumsalzes der Acetessigsäure erfolgte modifiziert nach LJUNGGREN (196) durch Verseifung von Acetessigsäure-Methylester mit NaOH. Anschließend wurde das Natrium-Acetacetat mit tiefgekühltem Aceton ausgefällt und zur Abtrennung des Acetons und des unverseiften Acetessigsäure-Methylesters mehrfach mit Äther nachgewaschen . Die Aufbewahrung erfolgte bei $-20^{\circ}C$.

b) Meßansatz:

ab) Übersichtsspektren der Reaktionsprodukte der interferierenden Verbindungen mit alkalischer Pikratlösung:
2 ml wässrige Lösung der Jaffé-positiven Verbindung (10 - 14,8 mmol/l; Albumin: 0,4 mmol/l; Aceton: 20 mmol/l) + 0,5 ml HPi (40 mmol/l) + 0,7 ml NaOH (500 mmol/l)
Reaktionstemperatur: $35^{\circ}C$; Schichtdicke: 1 mm; Referenz: H_2O; Wellenlängenbereich: 320 - 600 nm; zur Aufzeichnung des Spektrums wurde der Reaktionsansatz 1:10 verdünnt.
Die Spektren wurden zu verschiedenen Zeiten nach Reaktionsbeginn aufgezeichnet. Zur Verbesserung der Reaktionsbedingungen wurde die Konzentration der Jaffé-positiven Verbindungen im Überschuß gewählt.

bb) Bestimmung der Extinktion und der Reaktionskinetik bei 486 nm:
0,2 ml wässrige Lösung des jeweiligen Chromogens (Konzentrationsbereich wie in a) angegeben) + 2 ml HPi (7,2 mmol/l bzw. 60 mmol/l) + 1 ml NaOH (0,35 mol/l)
Reaktionstemperatur: $20^{\circ}C$; $25^{\circ}C$; $35^{\circ}C$
Die Lösungen wurden vor dem Zusammengeben im Wasserbad auf die Reaktionstemperatur gebracht. Schichtdicke: 10 mm; Messung gegen Leerwert;

Wellenlänge: 486 nm (7,2 mmol/l Pikrat); Eichlösung: Kaliumchromat (62,69 mmol/l);
Wellenlänge: 499 nm (60 mmol/l Pikrat); Eichung mit Filter (gelb-mittel)

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten der Chromogene wurde die Absorption jeweils zu dem Zeitpunkt nach Reaktionsbeginn gemessen, zu dem unter den jeweiligen Reaktionsbedingungen bei der Umsetzung einer wässrigen Kreatininlösung (0,5 mmol/l) mit Hydroxy-Pikrat das Absorptionsmaximum erreicht wird, d.h. 25 Min. (35°C), 40 Min. (25°C) und 65 Min. (20°C) nach Reaktionsbeginn.

6.1.3. Einteilung der "Jaffé-Chromogene"

Die untersuchten interferierenden Verbindungen lassen sich sowohl aufgrund des Absorptionsspektrums ihrer farbigen Reaktionsprodukte, die sie mit alkalischer Pikratlösung bilden, als auch aufgrund der Kinetik bei dieser Reaktion in verschiedene Gruppen einteilen.

A) Einteilung nach dem Verlauf des Absorptionsspektrums (330 - 600 nm)

Typ I: Zwei Absorptionsbanden im sichtbaren Bereich; der molare Extinktionskoeffizient der längerwelligen Bande (ε_2) ist wesentlich kleiner als der Extinktionskoeffizient der kürzerwelligen Bande (ε_1). Aufgrund der unterschiedlichen Verhältnisse der Extinktionskoeffizienten der Maxima ergeben sich folgende Untergruppen:

1. $\varepsilon_1 \gg \varepsilon_2$: Aceton, Acetessigsäure, Brenztraubensäure, Oxalessigsäure ($\varepsilon_1/\varepsilon_2$: 5,1 - 12,0) (Abb. 28)

2. $\varepsilon_1 > \varepsilon_2$
   a): Kreatinin, Glycocyamidin, Hydantoin, Kreatin ($\varepsilon_1/\varepsilon_2$: 2,4 - 3,3) (Abb. 29)
   b): 2-Oxoglutarsäure, Albumin ($\varepsilon_1/\varepsilon_2$: 1,7) (Abb. 30)

Typ II: Eine Absorptionsbande im längerwelligen Bereich und eine Flanke im kürzerwelligen Bereich: Ascorbinsäure, Fructose, Glucose, Glucosamin, Glucuronsäure (Abb. 31 - Abb. 35).

B) Einteilung nach dem Ablauf der Absorptionsänderung im langwelligen Bereich

a) rasch reagierende Chromogene: Aceton, Acetessigsäure, Glycocyamidin. Das Extinktionsmaximum wird eher (Acetessigsäure, Aceton) bzw. zu einem ähnlichen Zeitpunkt erreicht wie bei der Jaffé-Reaktion (Abb. 33)

b) langsam reagierende Chromogene: Die Umsetzung mit alkalischer Pikratlösung ist 180 Min. nach Reaktionsbeginn noch nicht abgeschlossen.
Aufgrund des Verlaufs der Extinktionsänderung im langwelligen Bereich in Abhängigkeit von der Zeit ergeben sich bei diesen Verbindungen folgende Untergruppen:

b_1) lineare Extinktionszunahme: Albumin, Hydantoin, Kreatin, Oxalessigsäure (Abb. 34);

b_2) Extinktionszunahme entspricht etwa einer Exponentialfunktion: Ascorbinsäure, Brenztraubensäure, 2-Oxoglutarsäure (Abb. 35);

b_3) biphasischer Extinktionsverlauf: Fructose, Glucose, Glucosamin, Glucuronsäure (Abb. 32).

Bei allen Chromogenen wurde in den untersuchten Konzentrationsbereichen eine lineare Beziehung zwischen der Chromogenkonzentration und der zum jeweiligen Zeitpunkt der maximalen Absorption der Jaffé-Reaktion bestimmten Extinktion ihres Reaktionsproduktes mit alkalischer Pikratlösung gefunden.
Natrium-Acetat, Harnsäure, ß-Hydroxybuttersäure und Methylguanidin führen bei Umsetzung mit alkalischer Pikratlösung

nicht zu einer Absorptionsänderung im langwelligen Bereich.

6.1.4. Absorptionsspektren und mögliche Reaktionsformen

6.1.4.1. Chromogen-Typ I

Die Absorptionsspektren der Reaktionsprodukte von Aceton, Acetessigsäure, Glycocyamidin, Kreatin und Hydantoin zeigen im sichtbaren Bereich einen ähnlichen Verlauf wie das Spektrum des Jaffé-Adduktes (Abb. 28). Sie entsprechen im Verlauf und im Verhältnis der molaren Extinktionskoeffizienten ihrer beiden Banden den Spektren, die bei anionischen σ-Komplexen und EDA-Komplexen gefunden werden (287). Ein weiteres gemeinsames Charakteristikum besteht darin, daß das mit Pikrat zuerst gebildete Reaktionsprodukt instabil ist und sich bei der Weiterreaktion zu einer Verbindung umlagert, die nur eine Absorptionsbande im sichtbaren Bereich besitzt.

Die Reaktion von Aceton mit Pikrat im alkalischen Milieu wurde bereits eingehend untersucht (152, 176). Aufgrund spektroskopischer und NMR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß zuerst ein Acetonat-Carbanion entsteht, welches sich kovalent an ein unsubstituiertes Ring-C-Atom des Pikrates unter Ausbildung eines Meisenheimer-Komplexes anlagert. Dieser bedingt die typische Rotfärbung mit Absorption im langwelligen Bereich und interferiert bei der Jaffé-Reaktion. Der Meisenheimer-Komplex reagiert weiter unter Abspaltung eines Protons von der freien Methylgruppe des Acetonat-Restes (152). Das entstandene Carbanion lagert sich dann kovalent an das noch freie, unsubstituierte Ring-C-Atom des Meisenheimer-

Komplexes unter Ausbildung eines bicyclischen Anions an, das ein ähnliches Absorptionsspektrum wie die Diaddukte des Pikrates zeigt (152).

Für die Reaktion von Acetessigsäure mit alkalischer Pikratlösung muß ein analoger Reaktionsmechanismus wie bei Aceton angenommen werden. Das primäre Reaktionsprodukt ist ebenfalls instabil und geht in eine Verbindung über, die nur eine Bande mit Maximum bei 392 nm aufweist.

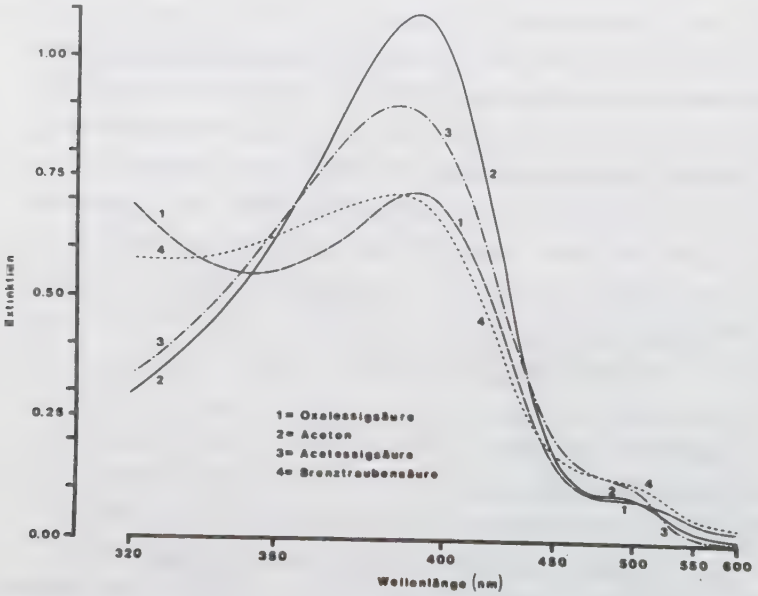


Abb. 28: Absorptionsspektren der primären Reaktionsprodukte von Aceton (12,5 mmol/l), Acetessigsäure (9,25 mmol/l), Oxalessigsäure (9,25 mmol/l) und Brenztraubensäure (9,25 mmol/l) nach Umsetzung mit alkalischer Pikratlösung (Pikrat: 6,25 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l); T: 25 °C; Schichtdicke: 1 mm (Verdünnung 1:10)

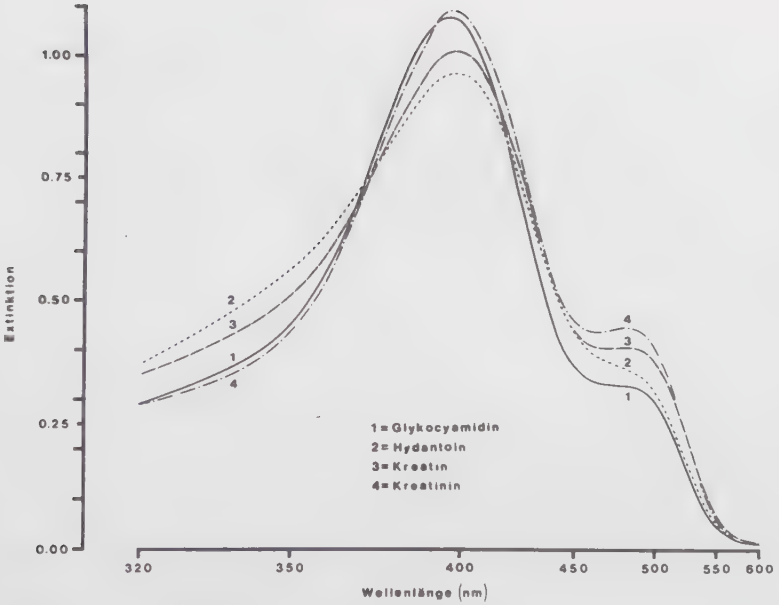


Abb. 29: Absorptionsspektren der primären Reaktionsprodukte von Kreatinin (6,25 mmol/l), Glycocyamidin (9,25 mmol/l), Hydantoin (9,25 mmol/l) und Kreatin (9,25 mmol/l) nach Umsetzung mit alkalischer Pikratlösung (Pikrat: 6,25 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l); T:25 °C; Schichtdicke: 1 mm (Verdünnung 1:10)

Die Reaktion von Glycocyamidin mit alkalischer Pikratlösung läßt aufgrund der Reaktionskinetik und des Spektrums des Reaktionsproduktes einen ähnlichen Reaktionsmechanismus wie bei der Jaffé-Reaktion vermuten.

Bei der Umsetzung von Hydantoin und Kreatin mit Pikrat im alkalischen Milieu deutet der zeitliche Ablauf der Absorptionsänderung bei 486 nm (Abb. 34) darauf hin, daß der Farbreaktion eine Reaktion I. Ordnung vorgeschaltet ist, wobei es sich nur um eine Hydrolyse handeln kann. Eines der bei der Hydrolyse entstehenden Spaltprodukte

- bei Hydantoin kommt Hydantoinsäure in Frage; bei Kreatin können nach Abspaltung von Ammoniak Methylhydantoinsäure und Methylhydantoin oder Harnstoff und Sarkosin entstehen (117) - lagert sich unter Ausbildung eines roten Molekülkomplexes kovalent an Pikrat an. Die primären Reaktionsprodukte von Kreatin und Hydantoin verhalten sich ähnlich wie die Reaktionsprodukte der anderen Verbindungen dieser Gruppe.

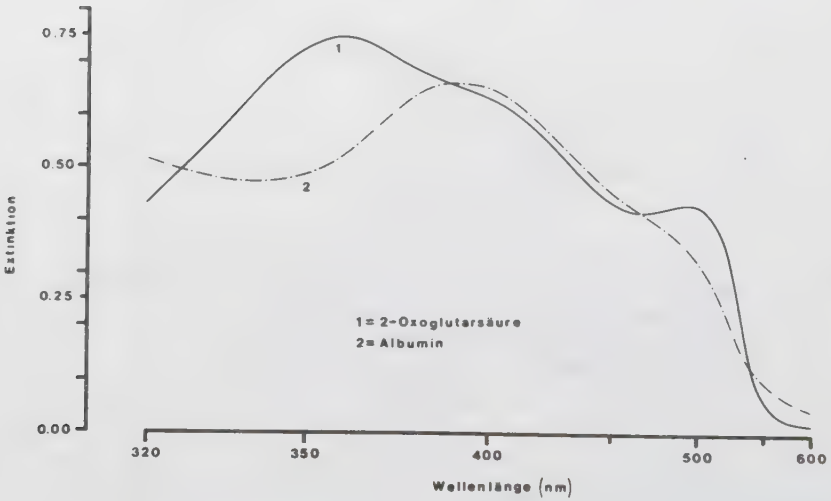


Abb. 30: Absorptionsspektren der Reaktionsprodukte von Albumin (0,25 mmol/l) und 2-Oxoglutarsäure (6,25 mmol/l) nach Umsetzung mit alkalischer Pikratlösung (Pikrat: 6,25 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l) T: 25°C; Schichtdicke: 1 mm; Verdünnung: 1:10

Oxosäuren neigen im alkalischen Milieu zur Adduktbildung. Daher ist bei Umsetzung der hier untersuchten Ketocarbonsäuren (Brenztraubensäure, Oxalessigsäure und 2-Oxoglutarsäure) mit alkalischer Pikratlösung ebenfalls eine Adduktbildung mit Pikrat zu erwarten. Der Verlauf der Absorptionsspektren ihrer farbigen Reaktionsprodukte mit Hydroxy-Pikrat weist auf das Vorliegen eines Cyclohexadienat-Komplexes hin (Abb. 28, Abb. 30). Es ist anzunehmen, daß es hier ähnlich wie bei den anderen Farbreaktionen, die zwischen Polynitroaromaten und α-Methylen- bzw. α-Methylketoverbindungen im alkalischen Milieu ablaufen (48, 175, 176), durch Protonenabspaltung von einer aciden Methyl- oder Methylengruppe zur Bildung eines Carbanions kommt, welches sich kovalent an den Nitroaromaten anlagert. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt bei diesen Verbindungen in der gleichen Reihenfolge - von Brenztraubensäure über 2-Oxoglutarsäure zur Oxalessigsäure (Abb. 34, Abb. 35) - ab, in welcher der positiv-induktive Effekt der Carboxylgruppe auf die Methyl- bzw. Methylengruppe zunimmt.

Bei der Reaktion von Albumin mit alkalischer Pikratlösung findet sich ein kontinuierlicher Anstieg der Absorption bei 486 nm (Abb. 34), wobei dE/dt mit steigender Albuminkonzentration zunimmt. Zwar konnte eine reversible Adduktbildung des Pikrates mit den Guanidinogruppen der Arginin-Anteile und daneben, in geringem Ausmaß, mit den ε-Aminogruppen der Lysin-Anteile des Albumin-Moleküls nachgewiesen werden (297), jedoch deutet die hier beobachtete Kinetik eher auf eine Hydrolyse der Albumin-Moleküle mit anschließender Adduktbildung der Hydrolyse-Produkte - möglicherweise Arginin und Lysin - mit Pikrat hin.

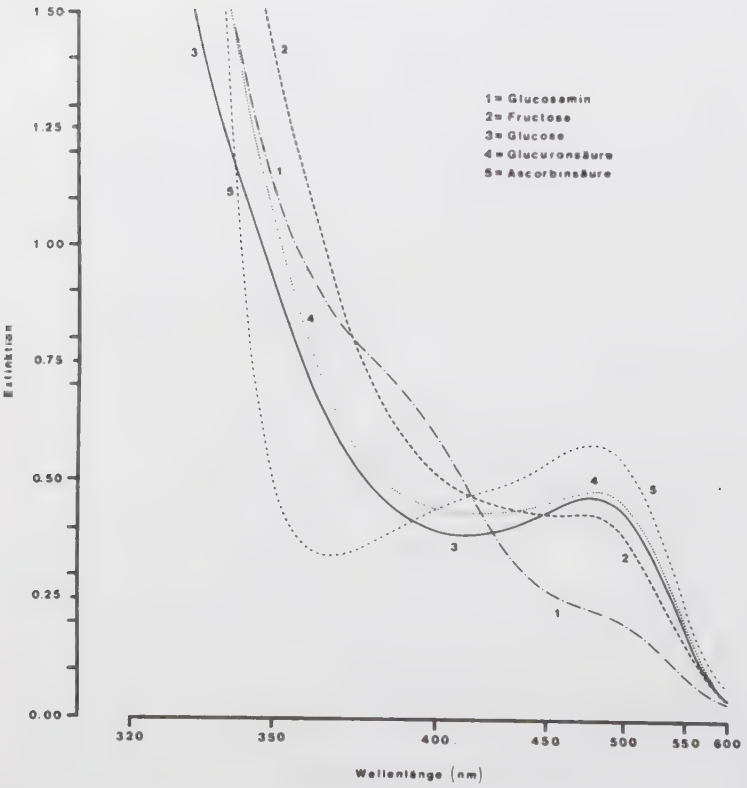


Abb. 31: Absorptionsspektren der Reaktionsprodukte von Glucose (9,25 mmol/l), Fructose (9,25 mmol/l), Glucosamin (9,25 mmol/l), Glucuronsäure (9,25 mmol/l) und Ascorbinsäure (9,25 mmol/l) nach Umsetzung mit alkalischer Pikratlösung (Pikrat: 6,25 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l), T: 25°C, Schichtdicke: 1 mm, Verdünnung: 1:10

6.1.4.2. Chromogen-Typ II

In einem Reaktionsansatz von Glucose mit alkalischer Pikratlösung konnte dünnschichtchromatographisch Pikraminsäure als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden (266, 267).
Das Pikramat-Spektrum, welches im sichtbaren Bereich nur eine Bande mit Maximum bei 408 nm aufweist, unterscheidet sich jedoch deutlich von dem Absorptionsspektrum des Reaktionsproduktes, das von uns 120 Min. nach Reaktionsbeginn gefunden wurde (Abb. 31). Das Maximum der längerwelligen Bande liegt hier bei 480 nm. In diesem Bereich zeigt die Extinktionsänderung in Abhängigkeit von der Zeit einen biphasischen Verlauf (Abb. 32). Es ist anzunehmen, daß dieser Ausdruck einer Zweistufenreaktion ist, bei der es zuerst durch Reduktion einer NO_2-Gruppe der Pikrinsäure zur Bildung von Pikramat kommt. Pikraminsäure absorbiert bei 486 nm etwas schwächer ($\varepsilon = 4,9 \cdot 10^6\ cm^2 mol^{-1}$), so daß die geringe Größe von dE/dt in der ersten Reaktionsphase hierauf zurückgeführt werden kann. Die sprunghafte Extinktionszunahme, die bei allen Messungen jeweils erst dann auftrat, wenn die Extinktion der ersten Phase einen bestimmten Wert erreicht hatte, deutet darauf hin, daß eine gewisse Mindestkonzentration eines der Reaktionspartner erforderlich ist, um die Weiterreaktion zu starten. Die zweite Reaktionsstufe setzt um so eher ein, je größer neben der Pikratkonzentration die Konzentration der reduzierenden Verbindung, z.B. Glucose, und/oder je höher die Reaktionstemperatur ist.
Für die Weiterreaktion kommt eine Komplexbildung zwischen Pikramat und Glucose oder zwischen Pikrat bzw. Pikramat und dem Oxydationsprodukt der Glucose (Gluconsäure) in Frage. Die entstehende Verbindung ist stabil. Eine Weiterreaktion der Gluconsäure zur Zuckersäure erscheint unwahrscheinlich.

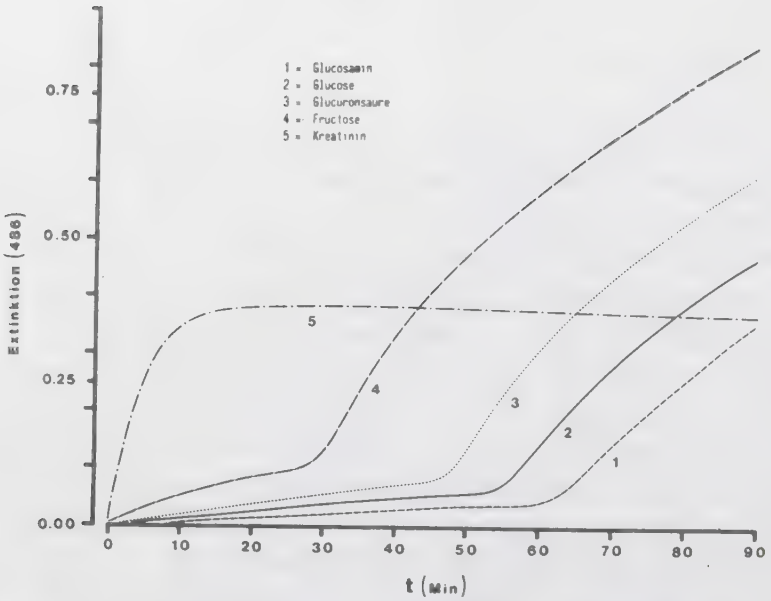


Abb. 32: Verlauf der Absorptionsänderung im langwelligen Bereich (486 nm) bei Umsetzung von Fructose (0,9375 mmol/l), Glucose (1,562 mmol/l), Glucosamin (4,375 mmol/l), Glucuronsäure (0,9375 mmol/l) und Kreatinin (0,03125 mmol/l) mit alkalischer Pikratlösung (Pikrat: 4,5 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l); T: 35°C; Schichtdicke: 10 mm; Referenz: Leerwert

Ein ähnlicher Reaktionsmechanismus ist aufgrund des Ablaufs der Absorptionsänderung im langwelligen Bereich und aufgrund des Absorptionsspektrums des Reaktionsproduktes auch bei Fructose, Glucosamin und Glucuronsäure zu erwarten. Sie besitzen ebenfalls reduzierende Eigenschaften. Die größere Reaktionsgeschwindigkeit (dE/dt), mit der die Umsetzung von Fructose in der ersten Reaktionsphase im Vergleich zu Glucose abläuft, unterstreicht die Annahme, daß der erste Reaktionsschritt eine Reduktion des Pikrates ist, da Fructose leichter oxydierbar ist als Glucose.

Bei der Reaktion von Ascorbinsäure mit alkalischer Pikratlösung weist der zeitliche Ablauf der Absorptionsänderung bei 486 nm keinen eindeutig biphasischen Verlauf auf. Das Absorptionsspektrum des Reaktionsproduktes entspricht jedoch dem Spektrum der Molekülkomplexe, die von den anderen Verbindungen dieser Gruppe in alkalischer Pikratlösung gebildet werden. Da Ascorbinsäure wesentlich stärker reduzierende Eigenschaften besitzt als die Monosaccharide, wird die erste Reaktionsphase, bei der vermutlich Pikraminsäure und Dehydroascorbinsäure entstehen, möglicherweise so rasch durchlaufen, daß sie bei Beginn der Aufzeichnung der Extinktionsänderung nicht erfaßt wird.

6.1.5. Reaktionskinetik

6.1.5.1. rasch reagierende Chromogene

Bei der Reaktion von Aceton und Glycocyamidin mit alkalischer Pikratlösung beeinflussen Pikratkonzentration und Reaktionstemperatur die Reaktionsgeschwindigkeit und den Extinktionskoeffizienten des Reaktionsproduktes in ähnlicher Weise wie bei der Jaffé-Reaktion. Acetessigsäure zeigt dagegen ein anderes Reaktionsverhalten. Hier führt sowohl eine Erhöhung der Reaktionstemperatur wie auch eine Senkung der Pikratkonzentration zu einer Verminderung des Extinktionskoeffizienten im Meßansatz (s. Tab. XI), der z.B. bei 25°C durch Reduzierung der Pikratkonzentration von 37,5 auf 4,5 mmol/l von $4,76 \cdot 10^5$ auf $1,38 \cdot 10^5$ $cm^2 mol^{-1}$ zurückgeht. Die Abnahme des Extinktionskoeffizienten ist auf die Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit zurückzuführen, die u.a. von der Pikratkonzentration abhängig ist. Dadurch wird die zu der Farbreaktion konkurrierend ablaufende Hydrolyse, die zu einer Spaltung des Acetessigsäure-

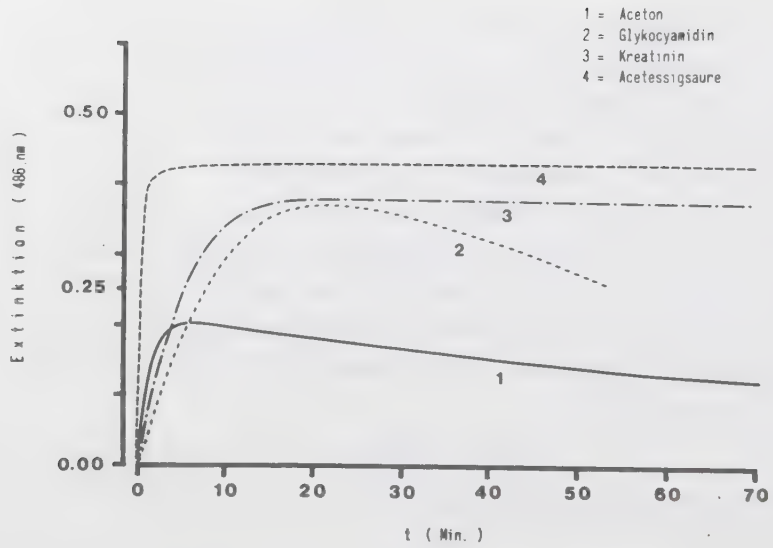


Abb. 33: Verlauf der Absorptionsänderung im langwelligen Bereich (486 nm) bei Umsetzung von Aceton (46,87 mmol/l), Acetessigsäure (1,25 mmol/l), Glycocyamidin (0,0625 mmol/l) und Kreatinin (0,03125 mmol/l) mit alkalischer Pikratlösung. Reaktions- und Meßbedingungen wie Abb. 32

Moleküls führt, ähnlich wie bei einem Anstieg der Reaktionstemperatur stärker wirksam. Das bei der Hydrolyse entstehende Aceton bildet mit Pikrat ein Addukt, dessen Extinktionskoeffizient wesentlich kleiner ist als der Extinktionskoeffizient des Adduktes von Acetessigsäure mit Hydroxy-Pikrat (s. Tab. XI).

6.1.5.2. langsam reagierende Chromogene

Bei der Umsetzung von Ascorbinsäure, Brenztraubensäure, Hydantoin, Kreatin, Oxalessigsäure, 2-Oxoglutarsäure sowie von Albumin mit Pikrat in alkalischem Milieu nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit bei

Anstieg der Pikratkonzentration und/oder der Reaktionstemperatur zu. Da die Reaktion dieser Störsubstanzen zum Zeitpunkt des Extinktionsmaximums der Jaffé-Reaktion noch nicht abgeschlossen ist, führt ein Anstieg der Pikratkonzentration und/oder der Reaktionstemperatur zu einer Zunahme der Chromogeninterferenz bei der Kreatininbestimmung (s. Tab. XI).

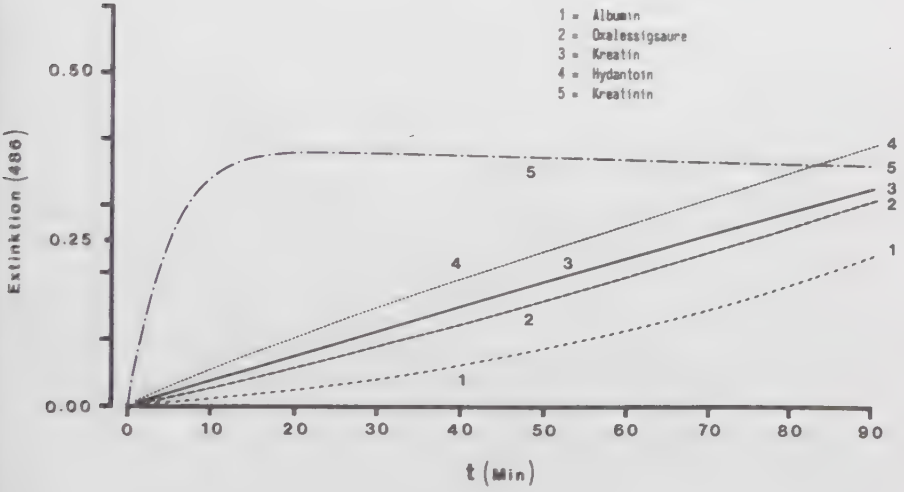


Abb. 34: Verlauf der Absorptionsänderung im langwelligen Bereich (486 nm) bei Umsetzung von Albumin (0,112 mmol/l), Hydantoin (0,468 mmol/l), Kreatin (0,468 mmol/l), Oxalessigsäure (1,875 mmol/l) und Kreatinin (0,03125 mmol/l) mit alkalischer Pikratlösung. Reaktions- und Meßbedingungen wie in Abb. 32

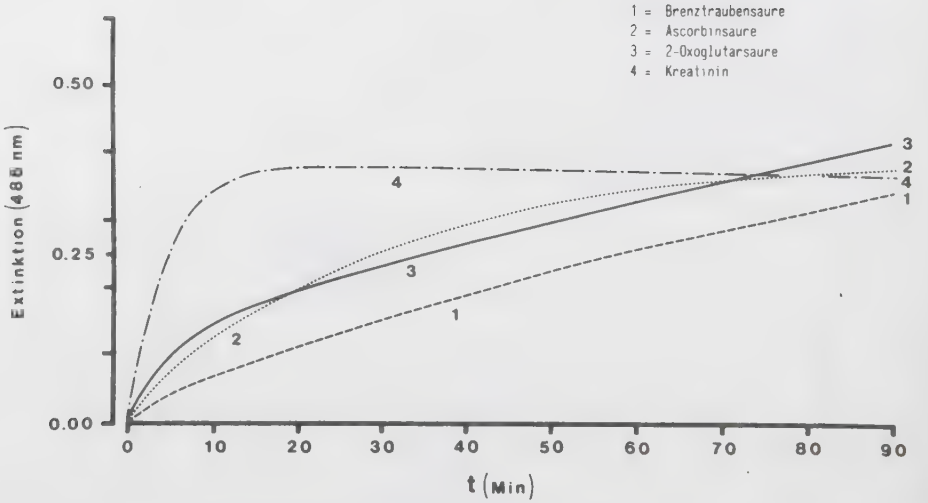


Abb. 35: Verlauf der Absorptionsänderung im langwelligen Bereich (486 nm) bei Umsetzung von Ascorbinsäure (0,468 mmol/l), Brenztraubensäure (0,375 mmol/l), 2-Oxoglutarsäure (0,468 mmol/l) und Kreatinin (0,03125 mmol/l) mit alkalischer Pikratlösung. Reaktions- und Meßbedingungen wie in Abb. 32

Substanz Konzentration im Normalserum (mg/100 ml)	ε_{486} (x $10^6 cm^2 mol^{-1}$)		Extinktionsverhältnis $\varepsilon_{Jaffé\text{-}Reaktion}/\varepsilon_{Chromogen}$ (486 nm)		Anteil (%) an der Gesamtabsorption (486 nm) im Meßansatz mit Normalserum	
	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C
Kreatinin 0,75	13,48	13,48	-	-	87,76 - 74,44	92,37 - 82,23
Glycocyamidin	5,915	5,915	2,27	2,27	-	-
Albumin 4200 - 5300	1,603	1,356	8,4	9,93	-	-
L(+)-Ascorbinsäure 0,41 - 1,14	0,585	0,457	23,01	29,46	1,32 - 3,13	1,08 - 2,70
2-Oxoglutarsäure 0,05 - 0,21	0,468	0,384	28,77	35,04	0,15 - 0,55	0,13 - 0,50
Brenztraubensäure 0,26 - 1,02	0,3997	0,340	33,72	39,57	1,15 - 3,81	1,02 - 3,59
Hydantoin	0,244	0,194	55,07	69,46	-	-
Kreatin 0,19 - 0,79	0,194	0,146	69,42	92,31	0,26 - 0,94	0,21 - 0,78
Acetessigsäure 0,05 - 0,46	0,088	0,138	152,64	97,5	0,04 - 0,32	0,07 - 0,56
D(-)-Fructose 5 - 10	0,069	0,033	193,99	404,61	0,19 - 0,32	0,09 - 0,17
Oxalessigsäure 0,12	0,064	0,051	208,06	260,52	0,06 - 0,05	0,05 - 0,04
D-Glucuronsaure 1,96 - 4,44	0,042	0,021	315,93	635,78	0,42 - 0,80	0,22 - 0,44
D(+)-Glucose 61 - 130	0,026	0,013	514,50	990,29	8,62 - 15,58	4,71 - 8,94
Aceton 0,23 - 0,35	0,004	0,004	3160	3160	0,01 - 0,02	0,01 - 0,02
D-Glucosamin 64-78	0,004	0,002	3040	5340	-	-

Tab. XI: a) Die molaren Extinktionskoeffizienten der Jaffé-Chromogene bei 486 nm nach Umsetzung mit alkal. Pikratlösung bei 25°C und 35°C; gemessen jeweils zum Zeitpunkt des Absorptionsmaximums der Jaffé-Reaktion.

b) Der prozentuale Anteil der wichtigsten Störsubstanzen an der Gesamtabsorption (486 nm) bei Kreatininbestimmung im Normalserum bei 25°C und 35°C. (Pikrat: 4,5 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l; Normalwerte aus "Documenta Geigy; Wiss. Tabellen" (88); PLENNER/HEINE "Normalwerte" (244); Normalwert für Kreatinin nach SZASZ (292)).

Bei den Verbindungen mit biphasischem Extinktionsverlauf führt ein Anstieg von Temperatur und/oder Pikratkonzentration ebenfalls zu einer starken Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit in der ersten Phase, wodurch die zweite Phase der Reaktion rascher erreicht wird (Abb. 36). Bei Glucose z.B. führt bei einer Konzentration von 2,49 mmol/l, wie sie in einem entsprechenden Reaktionsansatz mit 1 ml Normalserum vorkommt, unter den o.a. Reaktionsbedingungen (Pikrat: 4,5 mmol/l; NaOH: 109,3 mmol/l) ein Temperaturanstieg von 20°C auf 25°C zu einer Zunahme von dE/dt um das 1,5-fache. Bei einem Anstieg von 20°C auf 35°C nimmt dE/dt um das 4,5fache zu.

Bestimmungen des molaren Extinktionskoeffizienten eines Reaktionsansatzes von Glucose mit alkalischer Pikratlösung, die bei 486 nm jeweils zum Zeitpunkt der maximalen Absorption der Jaffé-Reaktion durchgeführt wurden, ergaben bei Temperatursenkung von 35°C(Meßzeitpunkt: 25 Min. nach Reaktionsbeginn) auf 25°C (Meßzeitpunkt: 40 Min. nach Reaktionsbeginn) eine Reduzierung der Extinktion um 51,9 %. Eine weitere Senkung der Temperatur von 25°C auf 20°C (Meßzeitpunkt: 65 Min. nach Reaktionsbeginn) führt dagegen nur noch zu einer unbedeutenden Verminderung der Extinktion, da sich in diesem Bereich eine Temperatursenkung auf die Umsetzung von Glucose mit alkalischer Pikratlösung in ähnlicher Weise auswirkt wie auf die Jaffé-Reaktion (Abb. 36).

6.2. DIE JAFFÉ-REAKTION MIT SERUM

Ausgehend von der Hypothese, daß die Perilymphe ein Ultrafiltrat des Serums ist (263), kann angenommen werden, daß die "Jaffé-Chromogene" in der Perilymphe in ähnlicher Konzentration vorliegen wie im Serum, so daß bei der Kreatininbestimmung in beiden Proben ein ähnlicher Absorptionsverlauf zu erwarten ist. Daher wurden die Untersuchungen zur Chromogen-Interferenz mit enteiweißten Serumproben durchgeführt.

6.2.1. Extinktionsverlauf und Chromogeninterferenz bei der Serum-Kreatininbestimmung

Bei Zugabe einer alkalischen Pikratlösung zu einer enteiweißten Serumprobe kommt es zu einem kontinuierlichen Extinktionsanstieg (Abb. 36), wobei dE/dt von den Reaktionsbedingungen abhängig ist und mit Anstieg von Serummenge, Pikratkonzentration, Reaktionstemperatur und NaOH-Konzentration zunimmt. Bei größerer Serummenge und höherer Temperatur (35°C) ist bereits 60 Min. nach Reaktionsbeginn ein biphasischer Verlauf der Extinktion zu beobachten.

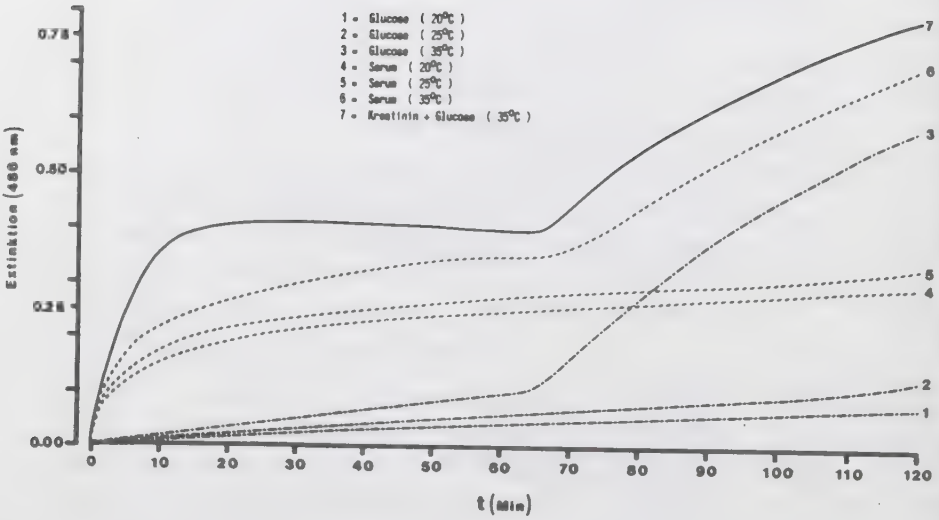


Abb. 36: Verlauf der Absorptionsänderung im langwelligen Bereich (486 nm) nach Zugabe von alkalischer Pikratlösung (Pikrat: 4,5 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l) zu einer:

a) wässrigen Glucoselösung (1,25 mmol/l) bei 20°C; 25°C; 35°C
b) wässrigen Lösung mit Kreatinin (0,03125 mmol/l) und Glucose (1,25 mmol/l) bei 35°C
c) mit HFIP enteiweißten Serumprobe (0,6 ml Normalserum (Kontrollogen L): Kreatinin 0,01659 mmol/l; Glucose 0,9 mmol/l) bei 20°C, 25°C, 35°C

(Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf den Meßansatz; Schichtdicke: 10 mm; Referenz: Leerwert)

Der kontinuierliche Anstieg der Absorption ist auf die Mitreaktion der langsam reagierenden Chromogene zurückzuführen, wobei Glucose im Normalserum die stärkste Bedeutung zukommt.

Ein Meßansatz mit wässriger Kreatininlösung, der Glucose in einer Konzentration zugesetzt wurde, wie sie im Normalserum vorliegt, zeigt nach Zugabe von alkalischer Pikratlösung einen ähnlichen Absorptionsverlauf wie die Serumprobe (Abb. 36). Wird der von uns gefundene Extinktionskoeffizient für das Reaktionsprodukt von Glucose mit alkalischer Pikratlösung zugrunde gelegt, so ergibt sich bei einer Serumkreatininkonzentration von 0,75 mg% und einer Glucosekonzentration von 61 - 130 mg% unter den von uns gewählten Reaktionsbedingungen bei einer Reaktionstemperatur von 35°C ein Glucose-Anteil an der Gesamtabsorption von 8,62 - 15,58 %, bei 25°C ein Anteil von 4,71 - 8,94 %. Aufgrund ihres Extinktionskoeffizienten und ihrer Serumkonzentration können neben Glucose auch Ascorbinsäure, Brenztraubensäure und in geringerem Ausmaß Kreatin und 2-Oxoglutarsäure den Extinktionsverlauf bei der Kreatininbestimmung in einem Normalserum beeinflussen. Fructose stört dagegen kaum, da ihre Serumkonzentration unter physiologischen Bedingungen sehr niedrig ist (5 - 10 mg/100 ml). Die Interferenz durch Fructose und andere Zucker wird jedoch bei Patienten bedeutsam, die mit Kohlenhydratlösungen - besonders Glucose, Fructose und Xylit - parenteral ernährt werden, da dann die durch Interferenz vorgetäuschten höheren Kreatininwerte zusammen mit der dadurch fälschlicherweise zu niedrig bestimmten endogenen Kreatinin-Clearance eine Einschränkung der Nierenfunktion vortäuschen können.

Glycocyamidin hat zwar unter den Jaffé-Chromogenen den größten Extinktionskoeffizienten, wird jedoch wesentlich langsamer aus Guanidinoessigsäure lactamisiert als Kreatinin aus Kreatin (24, 117, 202), so daß es im Serum nur in ganz geringer Konzentration vorkommt und kaum zu einer Störung der Kreatininbestimmung führt.

Die Interferenz durch Ketoverbindungen ist normalerweise relativ gering, kann jedoch nach längerer Nahrungskarenz (312) und bei Keto-

acidosen eine größere Bedeutung erlangen (47, 75, 126, 143, 155, 156, 165, 229, 232, 277, 312).

Bilirubin und Hämoglobin stören die Kreatininbestimmung mit dem Endpunktverfahren aufgrund ihrer Eigenabsorption. Bei hämolytischen Serumproben täuscht bereits eine Hämoglobinkonzentration von 0,1 g% bei 510 nm eine Erhöhung der Kreatininkonzentration um 0,244 mg% vor (132) . Bilirubin beeinflußt die Absorptionsmessung in gegensätzlicher Weise. Einerseits bedingt es durch Interferenz eine Zunahme der gemessenen Absorption, was sich jedoch erst bei Bilirubin-Serumkonzentrationen ab 3-5 mg% (164, 223, 313) stärker auf die Kreatinin-Bestimmung auswirkt. Andererseits führen höhere Bilirubin-Konzentrationen zu einer kontinuierlichen Abnahme der Gesamtabsorption, da Bilirubin in alkalischem Milieu dürch Oxydation allmählich in das schwächer absorbierende Biliverdin übergeht (165, 183, 279, 313).

Der prozentuale Anteil der Chromogeninterferenz, der bei der direkten Kreatininbestimmung mit dem Endpunktverfahren unter den von uns gewählten Reaktionsbedingungen (Pikrat: 4,5 mmol/l; NaOH: 109,375 mmol/l) auftreten kann, ist in Tab. XI zusammengestellt. Für das Normalserum wurde die von SZASZ (292) durch enzymatische Bestimmung (Creatinin-Amido-Hydrolase) ermittelte mittlere Kreatininkonzentration von 0,75 mg% (0,75 $\pm$ 0,29 mg%) angenommen. Bei dieser Konzentration fand sich bei einer Temperatur von 35°C bei 486 nm ein mittlerer Chromogen-Anteil an der Gesamtabsorption von 18,9 % (12,23 - 25,5 %), bei 25°C beträgt der mittlere Chromogen-Anteil 12,7 % (7,62 - 17,76 %). Wird die von HELGER et al. (134) mit dem kinetischen Verfahren für das Normalserum ermittelte Kreatininkonzentration von 0,87 mg% zugrunde gelegt, dann beträgt der Chromogen-Anteil an der Gesamtabsorption bei 35°C 16,9 % (10,8 - 23,01 %) und bei 25°C 11,2 % (6,7 - 15,8 %).

6.2.2. Verfahren zur Reduzierung der Chromogeninterferenz

Das Ausmaß der Chromogeninterferenz ist sehr stark von den Reaktionsbedingungen abhängig. Bei den langsam reagierenden Chromogenen kann es durch Senkung der Pikrat- und NaOH-Konzentration sowie durch Herabsetzung der Reaktionstemperatur eingeschränkt werden. Daher wird bei einigen Verfahren versucht, durch Senkung des pH im Reaktionsansatz auf Werte von 12,1 bis 11,5 die Chromogen-Mitreaktion und die Störung durch Protein zu reduzieren bzw. zu eliminieren (132, 248, 317) (s. auch Kap. 7.1.3.). Eine übermäßige Reduzierung der Pikrat- und NaOH-Konzentration führt jedoch zu einer Abnahme der Extinktion der Jaffé-Reaktion und kann daher bei dem von uns angestrebten Mikroverfahren nicht angewendet werden.

Die Chromogeninterferenz kann zusätzlich auch durch eine entsprechende Reaktions- und Meßtemperatur herabgesetzt werden. Der günstigste Temperaturbereich liegt hierbei zwischen 20 und 25°C, da dann einerseits die Mitreaktion der langsam reagierenden Chromogene noch sehr schwach ist und andererseits die Reaktionsbedingungen für die Jaffé-Reaktion sehr gut sind (s. Kap. 5.3.3.5.).

Die Verfahren, bei denen durch Abtrennung der Störsubstanzen bzw. Unterdrückung ihrer Mitreaktion die Spezifität der Jaffé-Reaktion bei der Kreatininbestimmung im Serum erhöht werden soll, sind in Tab. XII zusammengefaßt. Am häufigsten werden hiervon die Adsorptionsmethode mit Lloyd's Reagenz und in der letzten Zeit zunehmend die kinetischen Verfahren angewendet, wobei letztere für die klinische Routinebestimmung besonders geeignet sind, da sie mit Analyse-Automaten durchgeführt werden können. Bei der kinetischen Bestimmung wird die Kreatininkonzentration aus der Extink-

tionsänderung in der Anfangsphase der Jaffé-Reaktion ermittelt (s. Kap. 5.3.4.). Die Abtrennung der Störsubstanzen erfolgt hierbei aufgrund ihrer im Vergleich zum Kreatinin unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeit. Eine Störung durch Interferenz ist bei dieser Methode nur durch die rasch reagierenden Chromogene zu erwarten, wobei hauptsächlich Ketoverbindungen (150, 155, 277) - insbesondere Acetessigsäure - und Pyruvat von Bedeutung sind. Auch bei dieser Methode wirkt sich Bilirubin störend auf die Ergebnisse aus. Die kontinuierliche Abnahme der Gesamtextinktion als Folge der Oxydation des Bilirubins nach NaOH-Zugabe täuscht eine geringere Extinktionsänderung der Jaffé-Reaktion vor, so daß steigende Bilirubin-Konzentrationen scheinbar zu einer zunehmenden Verminderung der Kreatinin-Konzentration führen (84, 146, 155, 165, 183, 230, 276, 277, 313).

Für kleinere Probevolumina sind die meisten der in Tab. XII angeführten Verfahren mit Ausnahme der kinetischen Methode (s. Kap. 2.1.) nicht geeignet. In einem Probevolumen von 3 - 5 µl ist eine weitgehend spezifische, d.h. störungsfreie Bestimmung des Kreatinins mit der Jaffé-Reaktion bisher nur mit der von BROWN et al. (47) angegebenen Ultra-Mikromethode möglich. Hierbei wird das Kreatinin vor der Bestimmung durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie von den Störsubstanzen abgetrennt (s. Kap. 2.1.).

METHODIK	ADSORBENS TRÄGER REAGENZ	AUTOREN
A) Abtrennung des Kreatinins von den interferierenden Verbindungen der Probe		
(Kreatininbestimmung im Eluat bzw. auf dem Träger)		
I. Adsorption		
1.) Spezifische Adsorption		
	Erden (hydrierte Aluminiumsilikate)	
Selektive Adsorption des Kreatinins Desorption mit alkal. Pikratlösung	1a) Kaolin	Greenwald & McGuire (1918); Behre & Benedict (1922); Gaebler (1930); Hayman et al. (1935); Danielson (1936)
	1b) Montmorrilonite	Kayser et al. (1956)
	1c) Lloyd's Reagenz (Fuller-Erde)	Behre & Benedict (1922); Gaebler & Kaltch (1928); Gaebler (1930); Hayman et al. (1935); Hare (1950); Owen et al. (1955); Løken (1955); Ralston (1955); Roscoe (1958); Edwards & Whyte (1958); Cooper & Biggs (1961); Sever-Falgas (1962); Rose & Uhlemann (1966), Knoll & Stamm (1970); Müller et al. (1970); Knoll & Wisser (1973); Briddon (1973); Fomy et al. (1974); Knoll et al. (1978)
2.) Austauschadsorption Säulenchromatographie: Adsorption des Kreatinins aus saurer Lösung mit einem starken Kationenaustauscher. Elution mit Phosphatpuffer (pH 12,2 - 12,4)	Kationenaustauscher: Dowex 50 W X 8	Teger Nilsson (1961); Polar & Metcoff (1965);
	Dowex 50 x 4	Sadilek (1965); Rockerbie & Rasmussen (1967);
	AG 50 W X 2 Amberlite XAD-2 Na_2HPO_4/NaOH	Stoten (1968); Koenst & Freier (1971); Mitchell (1973); Kelsey et al. (1974)
3.) Verteilungschromatographie		
a) Papierchromatographie		Dent (1947); Maw (1948); Kostir & Rabek (1950); Acker et al. (1955); Ralston (1955); Paumgartner et al. (1963); Haller & Strauzenberg (1966)
b) Dünnschichtchromatographie	SiO_2	Beyermann (1964)
	Cellulose	Pataki (1964); Pataki & Keller (1965); Rink & Krebber (1966)
c) Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie	Kationenaustauscher: HS-Pellionex-SCX Natriumcitrat/NaOH-Puffer (pH 4,2)	Brown et al. (1977)
II. Elektrophorese Hochspannungselektrophorese	Pyridin/Eisessig (pH 6,23)	Thorn et al. (1958); Clotten & Clotten (1962)
III. Ausfällung Fällung des Kreatinins mit Tetraphenyloborat. Extraktion des Kreatinintetraphenyloborat mit Diaethylaether. Überführung des Kreatinins aus der Aetherphase in 2n HCl. Neutralisation der HCl und Kreatininbestimmung.	Natriumtetraphenyloborat; Diaethylaether; 2n HCl; 4 n NaOH	Beyermann (1964); Beyermann (1967); Beyermann et al. (1967)
B) Abtrennung der Chromogene aus der Probe		
I. Extraktion		
1.) Ausschütteln mit Aether	Diaethylaether	Linneweh & Linneweh (1934); Tanasky (1956); Narayanan et al. (1972)
2.) Gegenstromverteilung Abtrennung der Chromogene von dem Kreatinin aufgrund geringer Löslichkeitsunterschiede unter Ausnutzung des Gegenstromprinzips (mobile Phase: n-Butanol)	Acetatpuffer (pH 4,6) n-Butanol	Narayanan et al. (1972)
II. Komplexbildung Ausschaltung der Mitreaktion der Proteine und Kohlenhydrate durch Komplexbildung	Natriumdodecylsulfat Natriumtetraborat	Heinegard & Tiderström (1973)

Fortsetzung S. 158

METHODIK	ADSORBENS TRÄGER REAGENZ	AUTOREN
III. selektive Oxydation		
Selektive Oxydation der Chromogene; anschließend Extraktion der Oxydationsprodukte sowie des überschüssigen Oxydationsmittels	Jod Cer(IV)-Sulfat Kaliumbornydrid	Taussky (1954); Taussky (1956) Kostir & Sonka (1952); Ralston (1955) Spanner et al. (1956)
IV. Erhitzen		
Umwandlung von Acetessigsäure in Aceton durch Erhitzen der Probe; Entfernung der flüchtigen Chromogene (Aceton) durch anschließende Trocknung der Probe		Dunicz (1964); Kattermann (1967)
C) Bestimmung des Chromogenanteils an der Gesamtabsorption		
I.) selektive enzymatische Abtrennung des Kreatinins Bestimmung der Jaffé-positiven Verbindungen vor und nach enzymat. Spaltung des Kreatinins	a) Corynebacterium ureafaciens b) Creatininase (EC 3.5.4.-) c) Creatinin-Amidohydrolase	Miller & Dubos (1937); Krebs & Eggleston (1939); Allinson (1945) McLean & Gallwas (1972); McLean & Gallwas (1973) Kovar & Schmid (1979)
II. selektive Abtrennung des Jaffé-Adduktes Bestimmung des Chromogenanteils aufgrund der unterschiedlichen Säurestabilität der Reaktionsprodukte des Kreatinins und der Chromogene mit alkal. Pikratlösung (= "fading fraction" Verfahren)		
1.) Jaffé-Reaktion und Bestimmung des Kreatininwertes aus der Extinktionsdifferenz vor und nach Ansäuern	1 n H_2SO_4 Essigsäure (99 %)	Slot (1965) Grafnetter et al. (1967); Horáková et al. (1970); Koenst & Freier (1971); van Stekelenburg et al. (1978)
2.) Protein- und Kohlenhydratabtrennung durch Komplexbildung; anschließend Jaffé-Reaktion und "fading fraction" Verfahren	Natriumdodecylsulfat Natriumtetraborat Essigsäure (60 %)	Heinegard & Tiderström (1973)
D) Elimination der Chromogeninterferenz aufgrund der unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten		
I.) pH-Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit Unterschiedliche pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit bei Umsetzung der Chromogene mit alkal. Pikratlösung	Na_2CO_3, $NaHCO_3$-NaOH (pH 12 u. 10) Na_2HPO_4-NaOH (pH 11,5 u. 9,5)	Raabo & Wallöe-Hansen (1972) Yatzidis (1974)
II. Kinetische Verfahren Bestimmung der Kreatininkonzentration aus dE/dt in der Anfangsphase der Jaffé-Reaktion		Grisler & Castelnuovo (1970); Cook (1971); Fabiny & Ertingshausen (1971); Blennemann (1971); Larsen (1972); Luetgarten & Wenk (1972); Bartels et al. (1972); Zender & Jacot (1972); de Haan (1972); Bevill et al. (1972); Bartels & Böhmer (1973); Helger et al. (1974); Haury (1974); Ward et al. (1976); Hearn et al. (1977); Knoll et al. (1978)
E) Indirekte Kreatininbestimmung		
Potentiometrische Erfassung der Veränderung des Pikrates bei der Jaffé-Reaktion		
1.) Bestimmung der Änderung der Pikratkonzentration mit einer Pikrat-ionensensitiven Elektrode		Diamandis et al. (1977)
2.) Polarographische Erfassung der Änderung der Nitroreduktionswelle des Pikrates		Blass & Thibert (1974)

Tab. XII: Verfahren zur Reduzierung der Chromogeninterferenz bei der Kreatininbestimmung durch die Jaffé-Reaktion.

7. DIE ENTEIWEISSUNG

Bei der Jaffé-Reaktion stört Protein durch die Mitreaktion und durch seinen Puffereffekt, der zu einer unterschiedlichen OH^--Konzentration und damit zu unterschiedlichen Reaktionsbedingungen von Probe und Standard führt. Außerdem fällt Protein aus, wenn die zur Jaffé-Reaktion benötigten Reagenzien in der von uns gewählten Konzentration einer eiweißhaltigen Probe zugesetzt werden. Daher sollte vor der Kreatininbestimmung eine Enteiweißung der Probe durchgeführt werden. Hierfür stehen physikalische und chemische Verfahren zur Verfügung.

7.1. VERFAHREN ZUR ABTRENNUNG DES PROTEINS

7.1.1. Physikalische Methoden

Hierzu gehören die Ultrafiltration, die Dialyse, sowie die Fällung durch Hitzekoagulation. Der Vorteil dieser Verfahren liegt besonders darin, daß das Filtrat bei der Fällung hinsichtlich seiner Zusammensetzung und des pH-Wertes kaum verändert wird.

Die Ultrafiltration stellt das schonendste Verfahren zur Enteiweißung dar, da auf diese Weise ein völlig eiweißfreies Filtrat erhalten wird, das in seiner Zusammensetzung den natürlichen Gegebenheiten am meisten entspricht. Diese Form der Enteiweißung wurde bei der Kreatininbestimmung erstmals 1950 von KOSTIR u. RABEK (173) angewandt. Andere Autoren griffen diese Methode später ebenfalls auf. Bei der Druck-Ultrafiltration werden die makromolekularen Substanzen mittels Membranfilter entsprechender Porengröße unter Überdruck (122, 173) oder durch Zentrifugation (94) abgetrennt. Bei Vergleich der Kreatininwerte in dem durch Druck-Ultrafiltration

gewonnenen Filtrat mit den Kreatininwerten in einem nach FOLIN und WU enteiweißten Filtrat (1 ml Serum + 7 ml H_2O + 1 ml Na_2WO_4 (10 %) + 1 ml H_2SO_4 (2/3 n)), fanden sich im Ultrafiltrat ca. 5 % höhere Kreatininwerte (94).

Die Dialyse wird zur Abtrennung der Proteine bevorzugt bei der Kreatininbestimmung mit Analyseautomaten verwendet (45, 61, 89, 185, 319). Ein evtl. Verlust von Kreatinin durch Adsorption an der Dialysemembran kann vernachlässigt werden. Die Dialyse führt jedoch zu einer relativ großen Verdünnung des Filtrates.

Die Enteiweißung durch Hitzedenaturation (142) wurde von YATZIDIS (318) zur Kreatininbestimmung empfohlen. Hierzu wird die Serumprobe ca. 3 Min. einer Temperatur von 100°C ausgesetzt. Eine Adsorption des Kreatinins an das ausflockende Protein wurde nicht beobachtet. Die Wiederfindungsrate betrug 98 - 101 %. Der Autor geht jedoch nicht darauf ein, ob und inwieweit das Erhitzen die Lactamisierung des Serumkreatins zu Kreatinin beschleunigt.

7.1.2. Chemische Fällungsmethoden

Die wichtigsten chemischen Verfahren zur Proteinfällung beruhen auf den zwei Grundprinzipien: Fällung durch Dehydratation und Fällung als unlösliche Salze. Weniger von Bedeutung ist die Abtrennung der Proteine durch Ausschütteln mit Chloroform und die Fällung durch Invertseifen oder durch Aussalzen.

7.1.2.1. Fällung der Proteine durch Dehydratation

Die Fällung durch Dehydratation wird durch Zugabe von Alkoholen oder organischen Lösungsmitteln erreicht, welche die Hydratationshülle der Proteine verringern und die Dielektrizitätskonstante des Milieus vermindern. Die eiweißfällende Eigenschaft verhält sich hierbei umgekehrt proportional zur Polarität des jeweiligen Lösungsmittels (135). Zur Proteinfällung werden meist Methanol oder Aethanol sowie Aceton mit und ohne Säurezusatz verwendet (135). Von CHIOU et al. (66) wurde Acetonitril zur Enteiweißung bei der Kreatininbestimmung herangezogen. Damit wurde eine ausreichende Proteinfällung und eine gute Wiederfindungsrate erzielt.

7.1.2.2. Fällung der Proteine als unlösliche Salze

Die Fällung der Proteine als unlösliche Salze ist die am häufigsten angewandte Form der Enteiweißung von biologischem Material. Hierbei finden kationische und anionische Fällungsmittel Verwendung.

7.1.2.2.1. Kationische Fällungsmittel

Hierzu gehören Schwermetall-Ionen, wobei Zink-, Cadmium-, Quecksilber-, Uran-, Eisen-, Kupfer- und Bleisalzlösungen größere Bedeutung haben. Die eiweißfällende Tendenz ist der Ladungszahl direkt proportional.
Bei den kationischen Fällungsmitteln, die zur Enteiweißung für die Jaffé-Reaktion verwendet werden, wurde in den meisten Fällen eine sehr niedrige Wiederfindungsrate beobachtet, was auf eine Adsorption des Kreatinins an das ausgefällte Protein oder auf die Bildung schwerlöslicher Pikrate schließen läßt. Für die Enteiweißung mit Zinkhydroxyd nach SOMOGYI (1 Vol. Serum + 7 Vol H_2O + 1 Vol. 10 % $ZnSO_4$ + 1 Vol. 0,5 n NaOH) wurde eine Wiederfindungsrate von

59 % (304) bis 65 % (91) ermittelt. Bei dem von SOMOGYI modifizierten Verfahren mit 10 % $ZnSO_4$ und 0,5 n BaOH wurden 33 % (304) und mit $BaCO_3$-$Fe_2(SO_4)_3$ (= Steiner-Urban-West-Filtrat) als Fällungsmittel wurden 66,6 % (46) des zugesetzten Kreatinins wiedergefunden. Die besten Ergebnisse wurden bei Enteiweißung mit $Cd(OH)_2$ erzielt. Hierfür wird eine Wiederfindungsrate von 93 % (201) bis 97 % (124, 304) angegeben. Das häufig verwendete Uranyl-Acetat ist aufgrund seiner starken Eigenabsorption bei 500 nm für die Jaffé-Reaktion nicht geeignet.

Die kationischen Fällungsmittel haben den Vorteil, daß sie den pH von Standard und Probe kaum beeinflussen. Mit Ausnahme von $Cd(OH)_2$ sind sie jedoch aufgrund der niedrigen Wiederfindungsrate für die Enteiweißung bei dem Kreatinin-Nachweis mit der Jaffé-Reaktion nicht geeignet. Hinzu kommt, daß diese Verbindungen mit Pikrat schwerlösliche Salze bilden und eine ähnliche Salzbildung mit dem Jaffé-Addukt zu erwarten ist, so daß sie vor Zugabe des Jaffé-Reagenz aus dem Filtrat abgetrennt werden müßten.

7.1.2.2.2 Anionische Fällungsmittel

Am häufigsten finden bei der Serumenteiweißung anionische Fällungsmittel Verwendung. Hierzu gehören Perchlorsäure, m-Phosphorsäure, Wolframsäure, Molybdänsäure, Wolfram-Molybdänsäure, Trichloressigsäure, Pikrinsäure und Sulfosalicylsäure.

Bei der Kreatininbestimmung mit der Jaffé-Reaktion werden zur Enteiweißung bevorzugt Wolframsäure, Pikrinsäure und Trichloressigsäure verwendet. Für die Fällung mit Wolframsäure wurden verschiedene Modifikationen entwickelt, die sich nur in dem Schwefelsäure- und Wolframat-Anteil unterscheiden (s. Tab. XIII). Wie

	Fällungsmittel (Autor)	Fällungsansatz	Verdünnung der Serumprobe	Gesamtausbeute nach Enteiweißung (= % Wiederfindungsrate)
1.	**Wolframsäure**			
	Standardverfahren nach Folin & Wu (1919)	1 ml Serum + 7 ml H_2O + 1 ml 10% Na_2WO_4 + 1 ml 0.66 n H_2SO_4	1 : 10	84,7 - 93% (Camara et al. 1951; Haugen 1953; Mandel & Jones 1953; Edwards & Whythe 1958)
	Modifikationen			
a)	**Folin & Wu-Methode (1:5 Verdünnung) Haugen (1953); Mandel & Jones (1953)**	1 ml Serum + 2 ml H_2O + 1 ml 10 % Na_2WO_4 + 1 ml 0.66 n H_2SO_4	1 : 5	78,1 - 88 % (Haugen 1953; Mandel & Jones 1953)
b)	**Wu (1922)**	1 ml Serum + 8 ml H_2O + 0,5 ml 10 % Na_2WO_4 + 0,5 ml 0.66 n H_2SO_4	1 : 10	91 - 93,6 % (Haugen 1953; Owen et al. 1954)
c)	**Peters (1942)**	1 ml Serum + 1 ml 10 % Na_2WO_4 + 8 ml 1/12 n H_2SO_4	1 : 10	97 - 107 % (Peters 1942)
d)	**Brod & Sirota (1948)**	1 ml Serum + 1 ml H_2O + 1 ml 5 % Na_2WO_4+ 1 ml 0.66 n H_2SO_4	1 : 4	99,5 - 100,4% (Brod & Sirota 1948; Haugen 1953; Mandel & Jones 1953; Roscoe 1953; Husdan & Rapoport 1968)
e)	**Owon, Iggo & Scandrett (1954)**	1 ml Serum + 1,5 ml H_2O + 0,5 ml 10 % Na_2WO_4 + 1 ml 0.66 n H_2SO_4	1 : 4	99 - 100 % (Owen et al. 1954)
f)	**Miller & Miller (1952)**	1 ml Serum + 3 ml H_2O + 0,5 ml 10 % Na_2WO_4 + 0,5 ml 0.66 n H_2SO_4	1 : 5	88 % (Mandel & Jones 1953)
g)	**Knoll & Stamm (1970)**	1 ml Serum + 1,25 ml H_2O + 0,5 ml 10 % Na_2WO_4 + 1,25 ml 0.53 n H_2SO_4	1 : 4	98,3 - 100 % (Knoll & Stamm 1970)

Fortsetzung S. 164

	Fällungsmittel (Autor)	Fällungsansatz	Verdünnung der Serumprobe	Gesamtausbeute nach Enteiweißung (= % Wiederfindungsrate)
2.)	Pikrinsäure			
a)	Folin (1914)	1 ml Serum + 4 ml 1,3 % Pikrinsäure	1 : 5	
b)	Popper et al. (1937)	1 ml Serum + 3 ml 1,3 % Pikrinsäure	1 : 4	85 - 100 % (Brod & Sirota 1948; Haury 1965)
3.)	Trichloressigsäure			
a)	Hare (1950)	1 ml Serum + 2 ml H_2O + 2 ml 20 % CCl_3COOH	1 : 5	98 - 102 % (Hare 1950, Mandel & Jones 1953)
b)	Løken (1954)	1 ml Serum + 1 ml H_2O + 2 ml 1 n CCl_3COOH	1 : 4	98,7 % (Løken 1954)
c)	Beyermann (1964)	1 ml Serum + 1 ml 20 % CCl_3COOH	1 : 2	94 - 95 % (Beyermann 1964)
d)	Scheuerbrandt & Helger (1969)	1 ml Serum + 2 ml 1,5 m CCl_3COOH	1 : 3	98 % (Scheuerbrandt et al. 1969)
e)	Denning (1972)	1 ml Serum + 2,5 ml 10 % CCl_3COOH	1 : 3,5	97,8 % (Dennig et al. 1972)

Tab. XIII: Übersicht über die Enteiweißungsverfahren mit anion. Fällungsmitteln, die bei der Kreatininbestimmung mit der Jaffé-Reaktion verwendet werden.

aus Tab. XIII hervorgeht, hat die Art der Säure - bei der Fällung mit Wolframsäure auch das Verhältnis zwischen H_2SO_4 und Na_2WO_4 - einen Einfluß auf die Wiederfindungsrate und damit auf den gemessenen Kreatininwert.

Kreatinin wird bei Säurefällung je nach pH des Filtrates in unterschiedlichem Ausmaß an dem ausgefällten Eiweiß adsorbiert (52, 91, 124, 125, 127, 163, 190, 231, 257, 262, 295), wobei die geringste Adsorption im pH-Bereich zwischen 1 und 2 gefunden wurde. Das Verhältnis von Wolframat und Schwefelsäure muß daher z.B. so gewählt werden, daß ein günstiger pH erreicht wird.

KNOLL und STAMM (163) konnten durch Untersuchungen mit 1-^{14}C-Kreatinin nachweisen, daß bei einem Na_2WO_4/H_2SO_4-Konzentrationsverhältnis, bei dem nur die Hälfte der H_2SO_4 zur Freisetzung der Wolframsäure verbraucht und dadurch im Serumfiltrat ein pH-Wert von 1,1 erzielt wird, kein Kreatininverlust durch Adsorption an das ausgefällte Eiweiß auftritt. BEYERMANN (24) fand bei Überprüfung der Fällungsverfahren mit 1-^{14}C-Kreatinin, daß bei Enteiweißung mit Natrium-Wolframat-Schwefelsäure ca. 2 % des Kreatinins und bei Fällung mit Perchlorsäure ca. 3 % des Kreatinins im Rückstand verblieben, wogegen bei Proteinfällung mit 10 - 20 % Trichloressigsäure nur 0,4 % der Aktivität am Niederschlag festgehalten wurden.

Der Kreatininverlust durch die Eiweißfällung ist bei Bestimmung über die Wiederfindungsrate scheinbar höher als bei Bestimmung mit dem Isotopen-Verfahren. Ursache hierfür ist die unterschiedliche Pufferkapazität von Serumprobe und wässrigem Standard, die dazu führt, daß im Serumfiltrat eine niedrigere Wasserstoffionen-Konzentration zu finden ist, als in der Eichlösung (Abb. 37; Tab. XIV).

Dadurch ist nach Zugabe des Jaffé-Reagenz die OH^--Konzentration im Serumfiltrat höher als im Standard, wodurch die Jaffé-Reaktion mit unterschiedlicher Geschwindigkeit abläuft, was sich wiederum auf den gemessenen Kreatininwert auswirkt.

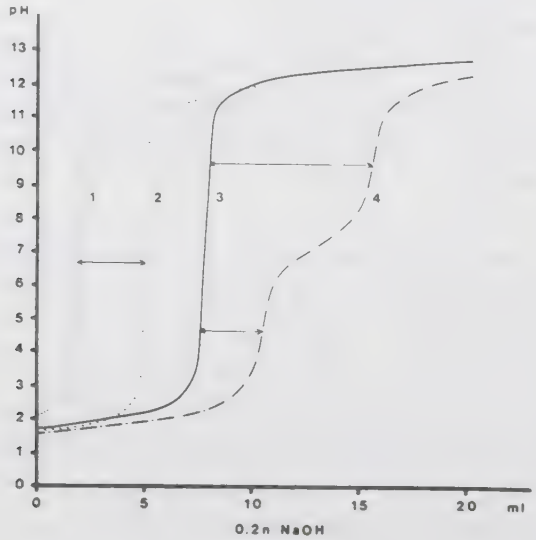


Abb. 37: Titrationskurven von wässrigem Kreatininstandard und enteiweißtem Serum
Jeweils 5 ml Serum (Proteingehalt 6,78 g /100 ml) wurden nach POPPER und MANDEL mit Pikrinsäure (5 ml Serum + 15 ml 1,3 % Pikrinsäure) bzw. nach BROD und SIROTA (5 ml Serum + 5 ml H_2O + 5 ml 5 % Na_2WO_4 + 5 ml 0,66n H_2SO_4) enteiweißt.
Der Standard (wässrige Kreatininlösung (0,9 mg%)) wurde wie die Serumprobe behandelt.
10 ml Überstand wurden anschließend mit 0,2 n NaOH titriert. Der Unterschied zwischen Kurve 1 (Serumfiltrat) und Kurve 2 (Standard) gibt an, wieviel Pikrinsäure im Serumfiltrat weniger vorhanden ist als im Standard. Die Distanz zwischen Kurve 3 (Serumfiltrat) und 4 (Standard) gibt an, wieviel mehr H_2SO_4 und Wolframat im Standard vorliegen.

Bei Enteiweißung mit Wolframat gewinnt das Pufferproblem noch stärkere Bedeutung, da Wolframat eine sehr gute Pufferwirkung besitzt (11). In der wässrigen Eichlösung liegt noch das gesamte Wolframat in freier Form vor, während es in der Serumprobe fast vollständig am Eiweißniederschlag adsorbiert ist (Abb. 37). Um die dadurch bedingte unterschiedliche Pufferkapazität von Standard und Probe auszugleichen, wurde die Standardlösung mit Na_2HPO_4/NaOH (134) oder Glycin/NaOH (13) gepuffert oder es wurde dem Standard Albumin (34, 131, 293) zugesetzt. Auf diese Weise wurde in Standard und Probe ein annähernd ähnlicher Verlauf der Kinetik der Jaffé-Reaktion erhalten.

Ein weiteres Problem ergibt sich bei der Säurefällung durch die unterschiedlichen Protein-Konzentrationen in den Serumproben, die zu einem wechselnden Säureüberschuß in den Filtraten führen. Hierdurch können in den einzelnen Proben einer Meßreihe ungleiche Reaktionsbedingungen auftreten. Besonders bei starken Schwankungen der Protein-Konzentration kann dies die Serumkreatinin-Werte beeinflussen. Verschiedene Autoren (52, 91, 190, 231) fanden bei Enteiweißung mit Wolframsäure eine direkte Beziehung zwischen der Wiederfindungsrate und der Proteinkonzentration. Durch Korrelierung der Säuremenge mit der vorher bestimmten Proteinkonzentration der Serumproben wurde versucht, dieses Problem zu umgehen (91, 190).

Bei der Eiweißfällung mit Säuren ergeben sich damit für die Kreatininbestimmung mit der Jaffé-Reaktion folgende Probleme:

1. Mitfällung des Kreatinins;
2. Unterschiedliche Wasserstoffionen-Konzentration in Probe und Eichlösung durch die Pufferwirkung des Serumproteins. Hierdurch ist ein identischer Ablauf der Jaffé-Reaktion in Probe und Standard nicht mehr gewährleistet.
3. Lactamisierung von Kreatin zu Kreatinin, sowie von Guanidinoessigsäure zu Glykocyamidin, d.h. Neubildung von Jaffé-Chromogenen.

4. Verminderung der Nachweisempfindlichkeit aufgrund der Verdünnung der Probe durch das Fällungsmittel.

7.1.3. Elimination des Protein-Störeffektes ohne Proteinfällung

Aufgrund der Problematik, die durch die Enteiweißung entsteht, wird seit 1970 in zunehmendem Maße versucht, die Bestimmung durch Verzicht auf die Enteiweißung zu vereinfachen. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse weichen nur geringfügig von den Werten ab, die mit enteiweißten Proben gefunden wurden. Die Reproduzierbarkeit der Meßwerte konnte aber bei einigen dieser Bestimmungsmethoden deutlich erhöht werden. Bei diesen Verfahren wird versücht, entweder die Proteine zu maskieren oder den Einfluß des Proteins auf den Meßwert durch Variation der physikalisch-chemischen Gegebenheiten auszuschalten.

Die Maskierung der interferierenden Anteile des Proteins erfolgt durch Zugabe von Natriumdodecyl-Sulfat (85, 132), welches mit Protein stabile Komplexe mit einer großen Anzahl negativ geladener Sulfat-Ionen bildet, wodurch sowohl eine Ausfällung der Proteine beim Ansäuern, wie auch eine Reaktion der Proteine mit Pikrat verhindert wird.
Bei dem von RAABO (248) und YATZIDIS (317) beschriebenen Differenzverfahren wird die Ausfällung des Proteins nach Pikratzugabe durch Zusatz einer auf pH 11,5 (317) bzw. 12,0 (248) gepufferten Pikratlösung zur Serumprobe vermieden. Bei diesem pH erfolgt auch die Kreatininbestimmung. Zur Elimination der Protein-Interferenz wird eine zweite Messung bei einem pH-Wert von 9,65 (317) bzw. 10,0 (248) durchgeführt, bei

dem die Jaffé-Reaktion extrem langsam abläuft und lediglich eine Reaktion des Serumproteins mit Pikrat erwartet wird.

Unter den Methoden zur Kreatinin-Bestimmung ohne Enteiweißung gewinnen die kinetischen Verfahren immer mehr an Bedeutung. Hier wird die Ausfällung von Protein durch Senkung der Pikrat-Konzentration verhindert (13, 134). Die störende Protein-Mitreaktion wird durch Messung der Geschwindigkeit der Farbentwicklung weitgehend ausgeschaltet (s. Kap. 6.2.2.). Diese Bestimmungsmethode ist sowohl für die manuelle, wie auch für die automatische Mikrobestimmung geeignet, wobei bereits Verfahren bis zu einem Probevolumen von 20 µl Serum (s. Kap. 2.1.) entwickelt wurden. Bei noch kleinerem Probevolumen wird der Meßfehler sehr groß und damit die Nachweisgrenze eingeschränkt, da die Extinktionsänderung in der Anfangsphase - 60 Sek. bis 5 Min. nach Reaktionsbeginn - der Jaffé-Reaktion, in der die Messung durchgeführt wird, selbst unter optimalen Bedingungen sehr gering ist.

7.2. DIE PROTEINFÄLLUNG BEI DER KREATININBESTIMMUNG IN KLEINEM PROBEVOLUMEN

Die Störeffekte des Proteins machen bei der Ultra-Mikrobestimmung unbedingt eine Abtrennung des Eiweisses erforderlich. Da die Proteinelimination mit dem kinetischen Verfahren bei einem Probevolumen von 3 - 5 µl wegen des hohen Meßfehlers, der dabei zu erwarten ist (s.o.), nicht mehr möglich ist, muß das Protein auf andere Weise abgetrennt werden. Das Enteiweißungsverfahren sollte dabei die folgenden Forderungen, die an ein ideales Enteiweißungsmittel gestellt werden, weitgehend erfüllen:

1. das Eiweiß muß vollständig aus dem Serum abgetrennt werden;
2. Cholesterin, Lecithin und andere Lipide sollten bei der Fällung ebenfalls mit entfernt werden, da sie schwerlösliche Pikrate bilden, die Trübungen erzeugen und so auch in geringster Konzentration die Extinktionswerte verändern können (24);
3. die Fällung sollte verlustfrei erfolgen;
4. die Chromogenneubildung darf durch das Fällungsmittel nicht gefördert werden; so sollte z. B. die verstärkte Lactamisierung von Kreatin zu Kreatinin sowie von Guanidinoessigsäure zu Glykocyamidin vermieden werden;
5. das Fällungsmittel sollte die Farbreaktion nicht beeinflussen. Falls das Enteiweißungsreagenz einen Einfluß auf die Farbreaktion hat, muß es sich mühelos aus dem Filtrat entfernen lassen.

Außerdem sollte die Verdünnung der Serumprobe durch das Fällungsmittel möglichst gering sein, um besonders bei kleinem Probevolumen eine Herabsetzung der Empfindlichkeit zu vermeiden.

Von den in Frage kommenden Enteiweißungsverfahren wäre die Druck-Ultrafiltration besonders günstig, da die Filtrate der Proben dann unverdünnt und in ihrer ursprünglichen Zusammensetzung nicht verändert sind. Ihre Anwendung im Ultra-Mikrobereich ist jedoch sehr aufwendig, da hierzu eine Membran-Ultrafiltration in Kapillaren erforderlich wäre. Die Dialyse ist für das kleine Probevolumen ebenfalls ungeeignet, da sie zu einer starken Verdünnung des Filtrates führt. Für die Enteiweißung bei der Ultra-Mikrobestimmung kommen daher lediglich die Hitzedenaturation, die Fällung durch Dehydratation und die anionische Fällung in Betracht.

7.2.1. Thermische Fällung

Die thermische Enteiweißung ist vom methodischen Standpunkt gesehen die rascheste und einfachste Form, Protein zu entfernen. Sie beeinflußt die nachgeschaltete Jaffé-Reaktion nicht und wäre damit für eine Mikrobestimmung geeignet. Zur Enteiweißung tauchten wir die in Kapillaren befindlichen Proben für 10 Sekunden in kochendes Wasser. Zur Abtrennung des ausgefällten Proteins wurden die Kapillaren anschließend ca. 40 Minuten bei 40 000 - 50 000 U min^{-1} zentrifugiert. Die Gefahr des Glasbruches wurde durch Zentrifugation der Kapillaren in Tetrachloräthylen reduziert.

Die thermische Fällung wird zwar für die Kreatininbestimmung empfohlen, erscheint uns jedoch nach den vorliegenden eigenen Untersuchungen für eine Mikrobestimmung wenig geeignet, da die Fällung bei kurzzeitigem Erhitzen quantitativ nicht vollständig erfolgt, andererseits bei längerem Erhitzen eine zunehmende Überführung von Kreatin in Kreatinin auftreten kann. HAURY (127) beobachtete bereits nach kurzzeitigem Erhitzen (30 Sek.) von Serumproben höhere Kreatininwerte als bei anderen Enteiweißungsverfahren.

7.2.2. Säurefällung

Bei entsprechender Konzentration des Fällungsmittels ist die Enteiweißung mit Säuren möglich, ohne daß eine zu starke Verdünnung der Probe auftritt. Um zu überprüfen, wie groß der Unterschied in der Wasserstoffionen-Konzentration von Standard und Probe nach Enteiweißung mit Säuren ist, wurde eine vergleichende Titration von Filtrat und wässriger Eichlösung mit 0,1 n NaOH durchgeführt. Es wurden nur anionische Fällungsmittel überprüft, die bei der Kreatininbestimmung verwendet werden. Die Ergebnisse sind in Tab. XIV zusammengefaßt.

Enteiweißungsverfahren	pH Standard	pH Serum-filtrat	NaOH-Differenz zwischen wässerigem Standard und Serumfiltrat (ml 0,1n NaOH/ml Serum)
1. Wolframsäure			
a) Folin & Wu (1 : 5) 1 ml Serum + 2 ml H_2O + 1 ml 10% Na_2WO_4 + 1 ml 0.66 n H_2SO_4	2.10	2.78	6.225
b) Peters (1942) 1 ml Serum + 1 ml 10% Na_2WO_4 + 8 ml 1/12 n H_2SO_4	2.22	3.08	5.30
c) Folin & Wu (1 : 10) 1 ml Serum + 7 ml H_2O + 1 ml 10% Na_2WO_4 + 1 ml 0.66 n H_2SO_4	2.22	2.92	5.20
d) Brod & Sirota (1948) 1 ml Serum + 1 ml H_2O + 1 ml 5% Na_2WO_4 + 1 ml 0.66 n H_2SO_4	1.48	1.60	3.52
e) Wu-Modifikation 1 ml Serum + 8 ml H_2O + 0,5 ml 10% Na_2WO_4 + 0,5 ml 0.66 n H_2SO_4	2.38	5.0	2.825
f) Miller & Miller (1952) 1 ml Serum + 3 ml H_2O + 0,5 ml 10% Na_2WO_4 + 0,5 ml 0.66 n H_2SO_4	2.22	5.05	2.82
2. Trichloressigsäure			
a) 1 ml Serum + 1 ml 3 n Trichloressigsäure	0.19	0.22	2.266
b) 1 ml Serum + 2 ml 20% Trichloressigsäure	0.25	0.29	2.115
3. Pikrinsäure			
1 ml Serum + 3 ml 1,3% Pikrinsäure	1,60	2.10	1.68
4. Perchlorsäure			
a) 1 ml Serum + 2 ml 30% Perchlorsäure	0.00	0.01	0.636
b) 1 ml Serum + 4 ml 0,6 n Perchlorsäure	0.31	0.35	0.267

Tab. XIV: Ergebnisse bei vergleichender Titration von wässriger Kreatininlösung und Serumfiltrat nach Enteiweißung mit anionischen Fällungsmitteln.

(Normalserum (6,78 g Protein/100 ml) und wässrige Kreatininlösung (Kreatininkonzentration: 0,9 mg%) wurden mit den in 1-4 aufgeführten Fällungsverfahren enteiweißt. Anschließend wurden jeweils 10 ml Überstand des Serumfiltrates bzw. der wässrigen Standardlösung mit NaOH bis pH 12 titriert (Metrohm Combititrator). Die aufgeführten Werte für die NaOH-Differenz (Mittelwerte aus jeweils 6 vergleichenden Titrationen) geben an, wieviel ml 0,1 n NaOH/ml Serum bei Titration des Serumfiltrates weniger verbraucht wurden als bei Titration der Kreatininlösung.)

Wie aus Tab. XIV zu ersehen ist, besteht nach Säurefällung eine mehr oder minder deutliche Wasserstoffionen-Differenz zwischen Standard und Probe, die erhebliche Unterschiede in der Kinetik der Jaffé-Reaktion erwarten läßt. Diese werden durch die beträchtlich variierende Proteinkonzentration in den untersuchten Körperflüssigkeiten noch verstärkt. Der wechselnde Säureunterschied von Standard und Probe läßt sich selbst bei Verwendung von Standardlösungen, die durch Puffer- oder Proteinzusatz eine ähnliche Pufferkapazität wie die jeweilige Körperflüssigkeit besitzen, nur unzureichend ausgleichen. Dadurch wird die Bestimmung nach Säurefällung besonders bei kleinem Probevolumen sehr ungenau. Weitere Schwierigkeiten ergeben sich bei der Mikrobestimmung durch Proteinlamellen, die bei Enteiweißung in Kapillaren an der Grenzfläche zwischen Serum und Säure auftreten und die Durchmischung erschweren, sowie durch Verdunstungseffekte beim Mischen.

Bei größerem Probevolumen können anionische Fällungsmittel zur Enteiweißung bei der Kreatininbestimmung mit der Jaffé-Reaktion herangezogen werden, wenn die Pufferkapazität des Serums in der wässrigen Standardlösung durch Puffer imitiert wird. Für die Ultra-Mikrobestimmung erscheint die Säurefällung dagegen wenig geeignet.

7.2.3. Fällung durch Dehydratation

Alkohole und andere leicht flüchtige organische Fällungsmittel bieten den Vorteil, daß sie nach erfolgter Eiweißfällung durch Abdunsten wieder aus dem Filtrat entfernt werden können. Die natürliche Zusammensetzung des Filtrates bleibt dadurch weitgehend unverändert, und eine Verdünnung der Probe wird vermieden. Damit erfüllen diese Fällungsmittel die Zusatzforderungen, die durch kleine Probevolumina an das Enteiweißungsmittel gestellt werden.

Nachdem die Probleme, die bei dem raschen Abdunsten des organischen Fällungsmittels aus dem Filtrat auftreten, gelöst werden konnten (s. Kap. 7.3.2.), wurde überprüft, welches Lösungsmittel sich am besten zur Enteiweißung bei der Kreatininbestimmung eignet. Neben einer vollständigen Proteinfällung muß die organische Verbindung eine gute Mischbarkeit mit Wasser und eine gute Löslichkeit für Kreatinin zeigen, um dessen Mitfällung zu vermeiden. Diese Parameter wurden bei verschiedenen Lösungsmitteln bestimmt. Es wurden nur organische Fällungsmittel geprüft, die leicht flüchtig sind und bei Vorversuchen eine gute Proteinfällung gezeigt hatten. Die Ergebnisse sind in Tab. XV zusammengefaßt.

Lösungsmittel	Sättigungskonz. (mg/ml)	Löslichkeit des Lösungsmittels in H_2O
Aceton (CH_3COCH_3)	0,045	∞
tert. Butanol (C_4H_9OH)	0,49	∞
Aethanol (C_2H_5OH)	1,33	∞
Hexachloraceton (CCl_3COCCl_3)	38,3	∞
Hexafluoraceton (CF_3COCF_3)	41,3	∞
Hexafluorisopropanol ($CF_3CHOHCF_3$)	311,7	∞

Tab. XV: Löslichkeit von Kreatinin in organischen Lösungsmitteln; Sättigungskonz. bei 20°C
(Sättigungskonz. von Kreatinin in H_2O (20°C): 87 mg/ml; Bestimmung der Kreatininkonz. bei 234 nm, $\varepsilon_{234} = 7,24 \times 10^6$ cm^2 mol^{-1}).

In Äthanol und Aceton ist Kreatinin schlecht löslich. Dies trifft auch für viele andere Alkohole und Ketone sowie für Nitrile zu. Perfluorierte Alkohole nehmen dagegen eine Sonderstellung ein, da sie aufgrund ihrer starken Tendenz zur Komplexbildung über Wasserstoffbrücken eine ausgezeichnete Lösungseigenschaft für viele Verbindungen mit basischen Gruppen - so auch für Kreatinin - zeigen.

Wie aus Tab. XV zu ersehen, zeigt Hexafluorisopropanol unter den untersuchten Verbindungen die beste Löslichkeit für Kreatinin. Vorversuche ergaben weiterhin, daß es sehr gute proteinfällende Eigenschaften besitzt. Da Hexafluorisopropanol außerdem leicht flüchtig ist, wurde seine Eignung für die Enteiweißung bei der Mikrobestimmung des Kreatinins mit der Jaffé-Reaktion genauer untersucht.

7.3. ENTEIWEISSUNG MIT HEXAFLUORISOPROPANOL

7.3.1. Chemische Charakterisierung von HFIP

1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP $[(CF_3)_2CH(OH)]$ ist eine farblose Flüssigkeit (d 20^oC: 1,617; Kp: 59^oC), die sich gut mit H_2O mischt (213).

Der kumulierte, negativ-induktive Effekt der Fluor-Atome führt dazu, daß:

1. HFIP schwach saure Eigenschaften besitzt (pKa: 9.30), da der Wasserstoff der Hydroxylgruppe leicht abgespalten werden kann.
2. HFIP eine sehr starke Tendenz zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen über das Proton der Hydroxylgruppe besitzt.

Aufgrund seiner Tendenz zur Komplexbildung über Wasserstoff-

brücken stellt HFIP ein sehr gutes Lösungsmittel für Verbindungen mit Amid-, Amino-, Alkohol- oder Ketogruppen dar (213).

Die ausgezeichnete Löslichkeit von Kreatinin in HFIP beruht auf der Bildung eines Kreatinin-HFIP-Komplexes, wobei HFIP sowohl mit der Ketogruppe, wie auch mit der Imino- und der Amidgruppe des Kreatinins Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann. Da die Kreatinin-HFIP-Komplexe nicht mit alkalischer Pikratlösung reagieren - möglicherweise lagert sich HFIP auch konkurrierend an Pikrat an -, muß Kreatinin vor Durchführung der Nachweisreaktion durch Abdunsten des HFIP aus dem Kreatinin-HFIP-Komplex wieder freigesetzt werden.

7.3.2. Das Abtrennen eines leicht flüchtigen organischen Fällungsmittels aus dem Überstand

Da das organische Fällungsmittel nach erfolgter Enteiweißung möglichst rasch aus dem Überstand abdunsten soll, die Oberfläche aber nicht vergrößert werden kann, muß es entweder durch Erwärmen oder durch Senkung des Kochpunktes, was durch Druckerniedrigung im Vakuum gelingt, abgetrennt werden. Beim Evakuieren bilden sich in den Kapillaren Gasblasen, die beim Entweichen einen Teil der Lösung mitreißen, wodurch Serumfiltrat verloren geht. Um dies zu vermeiden, wurde das Abdunsten durch Druckerniedrigung im Zentrifugalfeld durchgeführt. Da hier die Zentrifugalkraft dem Dampfdruck entgegenwirkt und die Oberflächenspannung überkompensiert, wird die Ausbildung von Gasblasen verhindert und ausgeschleuderte Tropfen werden in die Flüssigkeit zurückgeführt. Auf diese Weise wird eine verlustfreie, fraktionierte Trocknung der mit HFIP enteiweißten Serumprobe möglich, wobei erst langsam die organische und anschließend die wässrige Phase abgedunstet werden kann. Diese Form der Ab-

trennung des Fällungsmittels mit anschließender Einengung des Filtratvolumens läßt sich mit kleinem Probevolumen problemlos in Kapillaren durchführen.

Die Komplexe, die von perfluorierten Alkoholen mit Verbindungen gebildet werden, die eine Amid-, Imino- oder Ketogruppierung besitzen, haben allgemein einen höheren Kochpunkt als der perfluorierte Alkohol. Analog hierzu zeigte es sich auch, daß der Kreatinin-HFIP-Komplex weniger leicht flüchtig ist, als HFIP, dessen Kochpunkt bei 59^{o}C liegt. Bei der Trocknung eines HFIP-Kreatinin-Gemisches im Zentrifugalfeld kommt es daher zuerst zum Abdunsten von HFIP und erst danach als Folge der Veränderung des Kreatinin/HFIP-Verhältnisses zum Zerfall des Kreatinin-HFIP-Komplexes. Kreatinin wird wieder frei und geht allmählich in die wässrige Phase über, die ebenfalls abgedunstet werden kann, so daß schließlich nur die nicht flüchtigen Bestandteile der Probe zurückbleiben. Wie durch quantitative Untersuchungen (s. Kap. 7.3.3.3.) bestätigt werden konnte, tritt hierbei kein Kreatininverlust auf.

Zur Durchführung der fraktionierten Trocknung im Vakuum wurde eine Tellerzentrifuge in eine Gefriertrockenanlage (LEYBOLD-HEREUS GT 156) eingebaut (Abb. 38). Hiermit kann das HFIP-Serumfiltrat-Gemisch bei einer Umdrehungszahl von 500 U min^{-1} und einem Druck von 10^{-1} Torr verlustfrei getrocknet werden. Problematisch ist beim Zentrifugieren im Vakuum lediglich die fehlende Ableitung der Wärme, die von dem Zentrifugenmotor entwickelt wird. Dadurch erwärmt sich allmählich der Zentrifugenteller und damit auch die Probe. Daher wurde jeweils nicht länger als eine Stunde zentrifugiert und die Zentrifuge vor Benutzung gekühlt.

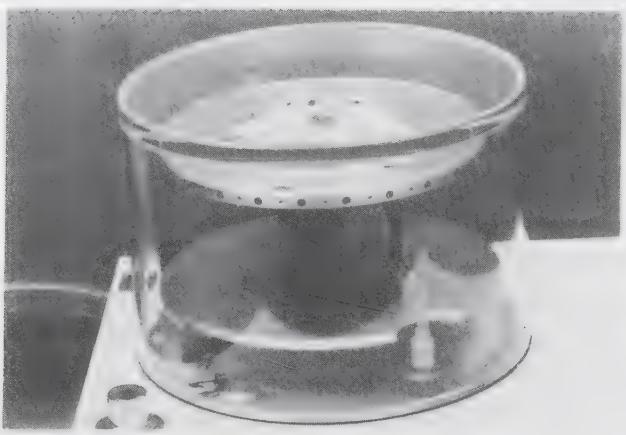


Abb. 38: Apparatur zur verlustfreien Trocknung eines HFIP-Serumfiltrat-Gemisches (Gefriertrocken-anlage LEYBOLD-HEREUS GT 156; Tellerzentri-fuge)

7.3.3. Eiweißfällung mit HFIP bei der Kreatininbestimmung

7.3.3.1. Das HFIP/Protein-Verhältnis

Zur Überprüfung, welche HFIP-Menge/ml Serum erforderlich ist, um eine ausreichende Proteinfällung zu erhalten, wurde jeweils 1 ml Normalserum (6,2 g% Protein) mit steigenden Mengen HFIP versetzt. Nach Abtrennen des ausgefallenen Proteins und Trocknung des HFIP-Filtrates im Zentrifugalfeld wurde der Rückstand wieder in H_2O gelöst. Durch Nachfällung mit Trichloressigsäure

(2 ml TCA (20 %)/ml Serumfiltrat), bzw. mit Perchlorsäure (4 ml 0,6 n $HClO_4$/ml Serumfiltrat) sowie mit Uranylacetat (2 ml Uranylacetat (1,6 %)/ml Serumfiltrat) wurde die HFIP-Menge/ml Serum bestimmt, mit der eine völlige Entfernung des Proteins erzielt werden kann.

Es zeigte sich, daß mindestens 0,25 ml HFIP/ml Serum - bezogen auf den Gesamtproteingehalt 4,1 ml HFIP/g Protein - erforderlich sind, um das Protein vollständig aus der Serumprobe zu entfernen. Wird mehr HFIP zur Enteiweißung verwendet, so besteht die Gefahr, daß wieder ein Teil des Proteins in Lösung geht, da HFIP einerseits zur Abspaltung von Peptiden von den Proteinen führen kann und andererseits aufgrund seiner starken Tendenz, Wasserstoffbrücken auszubilden, ein gutes Lösungsmittel für eine größere Zahl von Polypeptiden mit entsprechenden Gruppen ist (9). Aus Sicherheitsgründen sollte daher eine HFIP-Menge von 0,75 ml HFIP/ml Serum nicht überschritten werden.

7.3.3.2. Arbeitsvorschrift
(Fällungsansatz für Makrobestimmung)

Es werden 0,25 ml HFIP/ml Serum (4,1 ml HFIP/g Protein) der Serumprobe zugesetzt. Danach wird gut gemischt und das ausgefällte Protein ca. 15 Min. bei 6 000 U min^{-1} abzentrifugiert. Der Zentrifugatüberstand (Überstand A) wird mit der Pipette abgesaugt und in ein Polypropylen-Gefäß gegeben. Das ausgefällte Protein wird mit HFIP nachgewaschen und erneut abzentrifugiert (Überstand B). Der Überstand A wird anschließend bei 10^{-1} Torr und einer Umdrehungszahl von 500 U min^{-1} im Zentrifugalfeld getrocknet. Danach wird Überstand B in das Polypropylengefäß zu dem Rückstand von A gegeben und ebenfalls im Zentrifugalfeld getrocknet. Der Rückstand von A und B nach Trocknung kann dann mit H_2O gelöst und zur Kreatininbestim-

mung verwendet werden. Die zugegebene H_2O-Menge sollte dem Ausgangsvolumen der Serumprobe entsprechen. Wird ein kleineres Volumen im Meßansatz, d.h. eine größere Empfindlichkeit angestrebt, so kann der getrocknete Rückstand des Filtrates zur Kreatininbestimmung durch Zugabe von Pikrinsäure gelöst werden.

7.3.3.3. Wiederfindungsrate

In den Wiederauffindungsversuchsreihen wurde Kreatinin in gravimetrisch determinierter Menge den unten aufgeführten Lösungen (a) - d)) zugesetzt. Die jeweils angegebenen Werte sind die Ausgangskonzentrationen des Kreatinins.

a) Wässriger Kreatinin-Standard (0,1 mmol/l; 0,2 mmol/l; 0,4 mmol/l; 0,5 mmol/l; 0,8 mmol/l; 1,0 mmol/l; 1,6 mmol/l)

b) Wässriger Kreatinin-Standard: Konzentration wie in a); der Standard enthält jedoch außerdem jeweils die äquimolare Menge Kreatin.

c) Wässriger Kreatinin-Standard: Konzentration wie a); den Standardlösungen wurde Albumin (Ovalbumin Merck 24016) in einer Konzentration von 6 g/100 ml zugesetzt.

d) Normalserum (Kontrollogen L (Behringwerke AG); angegebene Kreatinin-Konzentration 0,0708 mmol/l) wurde mit steigenden Mengen Kreatinin versetzt. Hierzu wurde das lyophilisierte Humanserum durch Zugabe von wässrigen Kreatinin-Standard-Lösungen (Konzentration der Standardlösungen wie in a)) in Lösung gebracht. Gesamtkreatinin-Konzentration (= Serumkreatinin + zugesetztes Kreatinin): 0,0708 mmol/l; 0,1708 mmol/l; 0,2708 mmol/l; 0,4708 mmol/l; 0,5708 mmol/l; 0,8708 mmol/l; 1,0708 mmol/l; 1,2708 mmol/l; 1,6708 mmol/l.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden jeweils 200 µl der Lösungen a - d mit 50 µl HFIP versetzt. Das H_2O-HFIP-Gemisch (Lösung a; b) und das Filtrat, welches nach Abtrennung des ausgefällten Proteins (Lösung c; d) erhalten wurde, wurde im Zentrifugalfeld getrocknet. Der Rückstand wurde in 0,2 ml H_2O gelöst. Die Kreatinin-Bestimmung erfolgte durch Zugabe von 2 ml HPi (7,02 mmol/l) und 1 ml NaOH (0,3 mol/l); die Extinktionsbestimmung wurde 30 Min. nach Start der Reaktion bei 487 nm durchgeführt. Reaktionstemperatur: 25°C. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen vorgenommen. Für die Regressionsgeraden wurden folgende Gleichungen erhalten (x = Kreatininkonz. (mmol/l); y = Extinktion):

1. Lösung a (wässrige Kreatininlösung):
   $y = 0,0012 + 12,139\ x;\ r = 0,999$

2. Lösung b (wässrige Kreatininlösung + Kreatin):
   $y = 0,0002 + 12,161\ x;\ r = 0,999$

3. Lösung c (wässrige Albuminlösung + Kreatinin):
   $y = 0,00303 + 12,234\ x;\ r = 0,999$

4. Lösung d (Serum + Kreatinin):
   $y = 0,0045 + 12,238\ x;\ r = 0,999$

Die Wiederfindungsrate betrug bei dem wässrigen Standard (a) 99,55 % (s = 2,41; V = 0,0242), bei dem Kreatinin-Kreatin-Gemisch (b) 99,66 % (s = 2,56; V = 0,0257) und bei der wässrigen Albuminlösung 100,77 % (s = 2,41; V = 0,0239) der vorgegebenen Kreatinin-Konzentration. Im Normalserum betrug die Wiederfindungsrate für das zugesetzte Kreatinin 102,21 % (s = 3,86; V = 0,0378).
Wie aus den Aufstockungsversuchen hervorgeht, führt die Eiweißfällung mit HFIP und die anschließende Trocknung des Filtrates zu keinem Kreatininverlust, zu keiner Umwandlung von Kreatin in Kreatinin und zu keiner Neubildung von Chromogenen.

7.3.3.4. Präzision der Kreatininbestimmung bei Enteiweißung mit HFIP

Die Reproduzierbarkeit der Kreatininbestimmung im Serum bei Enteiweißung mit HFIP wurde im Makroversuch überprüft. Hierzu wurden 20 Einzelbestimmungen der Kreatininkonzentration in einem Normalserum (Kontrollogen L, K.-Nr. 409 (Behringwerke AG)) durchgeführt. Es wurde jeweils 1 ml Normalserum mit 0,25 ml HFIP enteiweißt. Nach Trocknung des Überstandes im Zentrifugalfeld wurde der Rückstand in 0,2 ml H_2O gelöst und die Kreatininbestimmung mit der Jaffé-Reaktion durchgeführt. Reaktionsbedingungen wie in 7.3.3.3. angegeben.

Für die Serum-Kreatinin-Konzentration wurde ein Mittelwert von 0,829 mg% ($s = 0,024$; $s_{\bar{x}} = 0,0054$) gefunden. Der mittlere relative Fehler - berechnet als relativer Variationskoeffizient - betrug 0,67 %. - Bei dem Übergang auf Halbmikro- bzw. Mikrobestimmungen werden die Variationskoeffizienten erfahrungsgemäß ungünstiger - .

7.3.3.5. Methodenvergleich

7.3.3.5.1. Enteiweißung mit HFIP und Trichloressigsäure

Normalserum (Kontrollogen L) wurde mit steigenden Mengen Kreatinin versetzt. Hierzu wurde das lyophilisierte Humanserum durch Zugabe von wässrigen Kreatinin-Standardlösungen verschiedener Konzentration in Lösung gebracht. Dadurch wurden Serumproben mit folgenden Kreatinin-Konzentrationen erhalten:

0,0708 mmol/l (= angegebene Kreatinin-Konzentration des Normalserums); 0,1708 mmol/l; 0,2708 mmol/l; 0,4708 mmol/l; 0,5708 mmol/l; 0,8708 mmol/l; 1,0708 mmol/l; 1,2708 mmol/l; 1,6708 mmol/l.

0,2 ml Serum wurden mit 0,05 ml HFIP bzw. mit 0,4 ml 1,5 m Trichloressigsäure (TCA) enteiweißt. Das TCA-Filtrat und der getrocknete Rückstand des HFIP-Filtrates wurden durch Zugabe von H_2O auf ein Endvolumen von jeweils 1,2 ml gebracht. Zur Kreatininbestimmung wurden 1 ml HPi (14,04 mmol/l) und 1 ml NaOH (0,3 mol/l) zugesetzt. Reaktionsbedingungen und Wellenlänge wie in 7.3.3.3. angegeben. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

Je nach Enteiweißungsverfahren wurde folgende Gleichung für die Regressionsgerade ermittelt (x = Kreatininkonz. (mmol/l); y = Extinktion):

1. HFIP-Fällung: $y = 0,0025 + 12,382\ x$; $r = 0,999$
2. TCA-Fällung: $y = 0,0056 + 12,88\ x$; $r = 0,999$

Die Kreatininwerte nach TCA-Fällung waren durchweg höher als nach HFIP-Fällung. Die mittlere Wiederfindungsrate betrug bei Enteiweißung mit HFIP 102,49 % (n = 19; s = 3,171; V = 0,0309) und bei Enteiweißung mit TCA 107,37 % (n = 19; s = 3,69; V = 0,0344). Bei Vergleich der nach Enteiweißung mit HFIP gefundenen Werte (x) mit den nach Enteiweißung mit TCA erhaltenen Werten (y) wurde folgende Gleichung für die Regressionsgerade gefunden:

$y = 0,004 + 1,0403\ x$; $r = 0,999$

Aus dem Verlauf der Regressionsgeraden ist zu ersehen, daß bei der hier beschriebenen Enteiweißung mit HFIP keine größeren

Fehler oder Störungen bei der Kreatininbestimmung zu erwarten sind als bei der häufig verwendeten Fällung mit Trichloressigsäure.

7.3.3.5.2. Serumkreatininwerte nach HFIP-Fällung und nach anderen Fällungsverfahren

Der von uns mit der HFIP-Methode für das Normalserum (Kontrollogen L) bestimmte Mittelwert von 0,831 mg% wurde mit den Mittelwerten verglichen, die bei Kreatininbestimmung durch die Jaffé-Reaktion nach Enteiweißung mit TCA (Methode nach POPPER et al. (246)), nach Enteiweißung mit Wolframat/Schwefelsäure und anschließender Adsorption an Fuller-Erde (Methode nach KNOLL und STAMM (163)) und ohne Enteiweißung mittels der kinetischen Methode (Methode nach BARTELS, BÖHMER et al. (13)) für Kontrollogen L ermittelt und zum Teil von dem Hersteller angegeben wurden (Tab. XVI).

METHODE	$\bar{x}$ (mg%)	2s	$\bar{x} \pm 2s$	n	METHODISCHE DIFFERENZ IM VERGLEICH ZUR HFIP- METHODE
HFIP- Fällung	0,829	0,048	0,781 - 0,877	20	
TCA- Fällung	0,85	0,1	0,75 - 0,95	20	+ 2,53 %
H_2SO_4/Na_2WO_4- Fällung und Adsorption an Fuller-Erde	0,80 *	0,1 *	0,7 - 0,9 *	30 *	- 3,50 %
kinetisches Verfahren	0,78	0,1	0,68 - 0,88	30	- 5,91 %

Tab. XVI: Serumkreatininkonz. (Kontrollogen L) nach HFIP-Fällung und nach anderen Proteinabtrennungsverfahren; Kreatininbestimmung mit der Jaffé-Reaktion; (Die gekennzeichneten Werte wurden vom Hersteller (Behringwerke AG) angegeben.)

Die methodische Differenz zwischen der HFIP-Methode und der sehr spezifischen und genauen Methode mit Adsorption an Fuller-Erde liegt innerhalb einer tolerablen Grenze.

7.4. DIE PROTEINFÄLLUNG MIT HFIP BEI DER ULTRAMIKROBESTIMMUNG DES KREATININS

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse kann HFIP bei der Kreatininbestimmung mit der Jaffé-Reaktion ohne besondere Einschränkung zur Enteiweißung herangezogen werden. Der methodische Fehler ist gering.

Für die Mikrobestimmung ergeben sich bei Eiweißfällung mit HFIP folgende Vorteile:

1. kein Kreatinin-Verlust durch Mitfällung;
2. durch die Trocknung des Filtrates kann das Probevolumen und damit das Volumen des Reaktionsansatzes sehr stark reduziert werden;
3. identische Reaktionsbedingungen in Standard und Probe, da der Puffereffekt des Proteins nicht zur Wirkung kommt;
4. kein Bestimmungsfehler durch den Volumenverdrängungseffekt (135), da zur Berechnung der Kreatininkonzentration ähnlich wie bei den kinetischen Methoden das Ausgangsvolumen der Serumprobe (Gesamtausgangsvolumen = Filtratvolumen + Proteinvolumen) zugrundegelegt werden kann. Der Fehler durch den Volumenverdrängungseffekt beträgt beim Serum ca. 5 % (18, 19), d.h. die Konzentration einer Substanz ist im Filtrat ca. 5 % höher als im Plasma.
5. Geringe Volumenfehler bei der Dosierung des Fällungsmittels haben keinen Einfluß auf das Meßergebnis.

Von Nachteil sind folgende Störeffekte, die speziell bei diesem Verfahren auftreten können:

1. Bei Überschreiten des hier angegebenen HFIP/Protein-Verhältnisses kann es zu einer Abspaltung von Peptiden kommen, die in Lösung gehen und die Extinktion der Jaffé-Reaktion durch Mitreaktion beeinflussen können. Dieser Nachteil wird besonders bei Hypoproteinämie bedeutsam.
2. Lipoide sind in HFIP sehr gut löslich. Sie können dadurch in den Reaktionsansatz gelangen und die Kreatininbestimmung durch Bildung schwer löslicher Pikrate stören.

8. DISKUSSION

Von den zahlreichen Verfahren, die zum Kreatinin-Nachweis entwickelt wurden, eignen sich nur wenige für die Kreatininbestimmung in Körperflüssigkeiten, die in Mengen bis maximal 5 µl zur Verfügung stehen. Entscheidend sind hohe Empfindlichkeit und geringer manipulatorischer Aufwand. Dies wird weitgehend bei Bestimmung mit dem Massenspektrometer oder Flammenionisationsdetektor und - mit Einschränkung - durch die Messung der Eigenabsorption des Kreatinins im UV-Bereich (200 - 215 nm) sowie durch die Jaffé-Reaktion erreicht.

Gaschromatographie und Massenspektrometrie erfüllen zwar beide Bedingungen, können jedoch aus methodischen Gründen bisher nur unter Vorbehalt zur Bestimmung des Kreatinins im Serum herangezogen werden (s. Kap. 2.2.4.). Bei Messung der Eigenabsorption ist eine ausreichende Empfindlichkeit gegeben, aber die erforderliche Abtrennung des Kreatinins von den anderen Substanzen verlangt einen großen manipulatorischen und apparativen Aufwand.

Bei der Jaffé-Reaktion liegen die Nachteile in der starken Abhängigkeit der Meßwertgrößen von den Reaktions- und Meßbedingungen, in der Instabilität des Reaktionsproduktes und in der eingeschränkten Spezifität der Farbreaktion. Nach Modifikation der Reaktions- und Meßbedingungen sowie der Enteiweißung kann die Jaffé-Reaktion, deren Reaktionsprodukt im gut meßbaren langwelligen Bereich einen hohen Extinktionskoeffizienten aufweist, zur Ultramikrobestimmung des Kreatinins verwendet werden.

Die hier vorliegenden Ergebnisse ermöglichen es, die wechselseitige Beeinflussung der Reaktanten im Meßansatz zu beurteilen und damit die günstigsten Reaktionsbedingungen zu finden sowie das Ausmaß der Mitreaktion der anderen Verbindungen der Probe abzuschätzen. Dadurch gelingt es, mit der Jaffé-Reaktion auch im Ultra-Mikrobereich Messungen mit ausreichender Spezifität und Genauigkeit durchzuführen.

8.1. REAKTIONSBEDINGUNGEN FÜR DIE JAFFÉ-REAKTION

Die Wechselwirkungen von Natriumhydroxyd, Natriumpikrat und Kreatinin in wässrigem Milieu sind vielfältig und führen über Gleichgewichtsreaktionen u. a. zum Jaffé-Addukt, einem anionischen σ-Komplex aus Kreatininat und Pikrat, bei dem Kreatininat kovalent an ein unsubstituiertes Ring-C-Atom des Pikrates angelagert ist. Der Molekülkomplex ist sowohl in neutraler, wie auch in alkalischer Lösung instabil. In neutraler Lösung zerfällt er wieder in seine Ausgangsverbindungen, während er in alkalischem Milieu durch nucleophile Addition einer weiteren Base (OH^-; Kreatininat) vorwiegend zu einem Diaddukt weiterreagiert.

In Abhängigkeit von der Hydroxyl-Ionen-Konzentration, der Kreatinin-Konzentration und der Temperatur laufen in einem wässrigen Reaktionsansatz mehrere Reaktionen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit nebeneinander ab. In biologischen Flüssigkeiten kommen durch die Mitreaktion verschiedener anderer Verbindungen, den sog. Jaffé-Chromogenen, weitere Gleichgewichte hinzu.

Untersuchungen dieser Gleichgewichte in wässrigem Milieu ergaben:

1. Pikrationen können durch kovalente Anlagerung von Hydroxyl-Ionen an C-1, C-3 und/oder C-5 anionische σ-Komplexe bilden, wobei Mono- und Diaddukte entstehen.
   Über Gleichgewichtsbedingungen gekoppelt enthält das Milieu daher neben Pikrat(Pi^-):

1a) 1-Hydroxy-Pikrat; 3-Hydroxy-Pikrat $\left[(PiOH)^{2-}\right]$:

$$\frac{}{(PiOH)^{2-}} = Pi^- \cdot OH^- \cdot K1 \cdot f_{OH^-} \cdot f_{Pi^-} / f_{(PiOH)^{2-}}$$

$$K1 = 8 \cdot 10^{-2} \ (mol^{-1}l)$$

1b) $$\frac{3,5\text{-Dihydroxy-Pikrat}\ \left[(Pi(OH)_2)^{3-}\right]}{(Pi(OH)_2)^{3-} = Pi^- \cdot OH^{-2} \cdot K1 \cdot K2 \cdot f^2_{OH^-} \cdot f_{Pi^-} / f_{(Pi(OH)_2)^{3-}}} :$$

$$K2 = 2,5 \cdot 10^{-3} (mol^{-1} l)$$

Ki = Bildungskonstante für Addukt i

f_j = Aktivitätskoeffizient der Substanz j

Bei niedriger OH^--Konzentration kann das Gleichgewicht 1b) vernachlässigt werden.

2. Kreatinin reagiert mit OH^--Ionen unter Abspaltung eines aciden Protons von der Methylengruppe, wobei Kreatininat (Kr^-) und H_2O entstehen. Gleichzeitig, jedoch mit wesentlich geringerer Reaktionsgeschwindigkeit, kommt es zur Bildung von Kreatin. In wässrigem alkalischem Milieu existiert folgendes Gleichgewicht:

$$Kr^- = \frac{Kr \cdot OH^-}{H_2O} \cdot K3 \cdot f_{Kr} \cdot f_{OH^-} / (f_{Kr^-} \cdot f_{H_2O})$$

$$K3_{25^oC} = 1098,704\ (49)$$

Die Bestimmung von K3 erfolgte aus dem durch potentiometrische Titration (49) ermittelten pK_a-Wert für Kreatinin (12,7), mit der durch das Massenwirkungsgesetz gegebenen Gleichung:

$$\frac{Kr^- \cdot H^+}{Kr} = 10^{-12,7} \qquad \text{(Gl. 1)}$$

Aus der Verknüpfung mit der Gesamtkonzentration (Kr_o)

$$\frac{Kr^-}{Kr_o} = \frac{1}{10^{pKa-pH} + 1} \qquad \text{(Gl. 2)}$$

kann der Kreatininat-Anteil bei diesem pK_a bestimmt werden. Die Abhängigkeit der relativen Kreatininat-Konzentration von der OH^--Konzentration ist in Tab. XVII aufgeführt.

OH^-	Kr^-/Kr_o	OH^-	Kr^-/Kr_o
0,05	0,49	1,0	0,952
0,1	0,66	1,5	0,967
0,2	0,798	2,0	0,975
0,5	0,908	3,0	0,983
0,7	0,932	4,0	0,988

Tab. XVII: Der Einfluß der OH^--Konzentration (mol/l) auf die relative Kreatininat-Konzentration

3. Bei Zugabe von Kreatinin zu alkalischer Pikratlösung entstehen 3-Kreatininat-Pikrat ("Jaffé-Addukt"), sowie die Diaddukte 3,5-Dikreatininat-Pikrat und Hydroxy-Kreatininat-Pikrat; letzteres kann sowohl als 1-Hydroxy-3-Kreatininat-Pikrat, wie auch als 5-Hydroxy-3-Kreatininat-Pikrat vorliegen.

3a) $\frac{\text{3-Kreatininat-Pikrat } \left[(PiKr)^{2-}\right]}{(PiKr)^{2-} = Kr^- \cdot Pi^- \cdot K4 \cdot f_{Kr^-} \cdot f_{Pi^-} / f_{(PiKr)^{2-}}}$:

3b) $\frac{\text{5(1)-Hydroxy-3-Kreatininat-Pikrat } \left[(PiOHKr)^{3-}\right]}{(PiOHKr)^{3-} = Kr^- \cdot OH^- \cdot Pi^- \cdot K4 \cdot K5 \cdot f_{Kr^-} \cdot f_{Pi^-} \cdot f_{OH^-} / f_{(PiOHKr)^{3-}}}$:

3c) $\frac{\text{3,5-Dikreatininat-Pikrat } \left[(Pi(Kr)_2)^{3-}\right]}{(Pi(Kr)_2)^{3-} = Kr^{-2} \cdot Pi^- \cdot K4 \cdot K6 \cdot f^2_{Kr^-} \cdot f_{Pi^-} / f_{(Pi(Kr)_2)^{3-}}}$:

Die in wässrigem Milieu auftretenden sechs miteinander gekoppelten Gleichgewichtsreaktionen erschweren die Auflösung des Systems und damit auch die Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen erheblich.

Da die Kreatinin-Konzentration vorgegeben ist, kann nur die Konzentration von Natrium-Pikrat und Natrium-Hydroxyd frei gewählt werden. Die Reaktionsbedingung ist dann optimal, wenn das Ionenkonzentrationsprodukt $Pi^- \cdot Kr^-$ ein Maximum aufweist. Es zeigt sich, daß in erster Näherung nur eine funktionelle Beziehung zwischen der Natrium-Hydroxyd- und Natrium-Pikrat-Konzentration besteht, die diese Bedingung erfüllt. Bei den Überlegungen hierzu wird vorausgesetzt, daß alle Aktivitätskoeffizienten (f_j) des jeweiligen Gleichgewichts konstant bleiben und in die Gleichgewichtskonstanten (Ki) mit einbezogen werden können, und daß die Diaddukte Dihydroxy-Pikrat $\left[(Pi(OH)_2)^{3-}\right]$ und Dikreatininat-Pikrat $\left[(Pi(Kr)_2)^{3-}\right]$ zu vernachlässigen sind. Die so entstandene Konstante wird mit KiA (i = 1, 2, 3, 4, 5, 6) bezeichnet ($Ki \cdot f_j \longrightarrow KiA$).

Bringt man die Gleichgewichtsbedingungen in Beziehung zur Gesamtkonzentration der Pikrinsäurederivate (Pi_o), so ergeben sich bei Einführung des maßgebenden Ionenkonzentrationsproduktes $Pi^- \cdot Kr^- = x$ sukzessive folgende Gleichungen:

$$Pi_o = Pi^- + (PiOH)^{2-} + (Pi(OH)_2)^{3-} + (PiKr)^{2-} + (PiOHKr)^{3-} + (Pi(Kr)_2)^{3-} \qquad \text{(Gl. 3)}$$

$$Pi_o = (1 + K1A \cdot OH^- + K1A \cdot K2A \cdot OH^{2-}) \cdot Pi^- + (K4A + K4A \cdot K5A \cdot OH^- + K4A \cdot K6A \cdot \frac{x}{Pi}) \cdot x \qquad \text{(Gl. 4)}$$

Analog ergibt sich für die Kreatiningesamtkonzentration (Kr_o):

$$Kr_o = \left(\frac{H_2O}{K3A \cdot OH^-} + 1\right) \cdot \frac{x}{Pi} + (K4A + K4A \cdot K5A \cdot OH^- + 2 \cdot K4A \cdot K6A \cdot \frac{x}{Pi}) \cdot x \qquad \text{(Gl. 5)}$$

Für $K2A$ und $K6A \approx 0$ kann Pi eliminiert werden.

$$Kr_o = \frac{\left(\frac{H_2O}{K3A \cdot OH^-} + 1\right) \cdot (1+K1A \cdot OH^-) \cdot x}{Pi_o - (K4A + K4A \cdot K5A \cdot OH^-) \cdot x} + (K4A + K4A \cdot K5A \cdot OH^-) \cdot x \qquad \text{(Gl. 6)}$$

Ist $Pi_o \gg x \cdot (K4A + K4A \cdot K5A \cdot OH^-)$ so erhält man aus der partiellen Ableitung $d_x/d_{OH} = 0$ folgende Grenzbedingung:

$$OH^- < \sqrt{\frac{H_2O}{K1A \cdot K3A}}$$

Die OH^--Konzentration darf diese Grenzbedingung nicht überschreiten. Damit x groß wird, ist eine hohe Pikratkonzentration zu wählen. Wäre $(PiOHKr)^{3-}$ zu vernachlässigen, dann müßte OH^- unabhängig von Pi_o und damit gleich der Grenzbedingung sein.

Von einer gewissen Mindestkonzentration an, die das 140 - 150fache der Kreatininkonzentration im Meßansatz beträgt, hat die Pikratkonzentration nur noch auf die Reaktionsgeschwindigkeit Einfluß. Von wesentlich entscheidenderer Bedeutung für die Empfindlichkeit ist die OH^--Konzentration, da mit steigender Basenkonzentration der Einfluß der Nebenreaktionen auf den Extinktionskoeffizienten der Jaffé-Reaktion zunimmt.
Bei Kenntnis der Gleichgewichtskonstanten des Systems ergibt sich die optimale NaOH-Konzentration aus der Gleichung:

$$OH^-_{opt}(mol/l) = \frac{\sqrt{H_2O}}{\sqrt{K3A(K4A \cdot K5A \cdot Pi_o + K1A)}} \qquad \text{(Gl. 7)}$$

H_2O : die Konzentration des Wassers im Reaktionsgemisch ist bei 25°C 998/18,026 = 55,364 (mol/l)

K1A: die Bildungskonstante für Hydroxy-Pikrat (0,08 $mol^{-1}l$) wurde durch Untersuchung von Spektren im System NaOH/HPi gewonnen.

K3A: die Säurekonstante des Kreatinins (1098,704) wurde durch potentiometrische Titration bestimmt (49).

K4A;K5A: K4A, die Bildungskonstante von Kreatininat-Pikrat ("Jaffé-Addukt") ist ebenso wie K5A, die Bildungskonstante von Hydroxy-Kreatininat-Pikrat, nicht bekannt. Beide Konstanten wurden abgeschätzt (≈ K4; K5).

Bei Vernachlässigung des Aktivitätskoeffizienten läßt sich die Bildungskonstante (K4) für Kreatininat-Pikrat $(PiKr)^{2-}$ auf folgende Weise berechnen:

$$K4 = \frac{(PiKr)^{2-}}{Kr^- \cdot Pi^-} = \frac{(PiKr)^{2-}}{\left[Kr_o - (PiKr)^{2-} - (PiOHKr)^{3-}\right] \cdot Pi^-} \quad \text{(Gl. 8)}$$

$$= \frac{1}{\left[\frac{Kr_o}{(PiKr)^{2-}} - 1 - \frac{(PiOHKr)^{3-}}{(PiKr)^{2-}}\right] \cdot Pi^-}$$

Messungen ergaben, daß - bezogen auf das Spektrum des reinen Jaffé-Adduktes $\left[(PiKr)^{2-}\right]$ - im Reaktionsansatz unter optimalen Bedingungen 98,6 % des Gesamtkreatinins (Kr_o) in $(PiKr)^{2-}$ überführt werden (s. Kap. 5.3.4.3.1.), d.h.

$\frac{(PiKr)^{2-}}{Kr_o} = 0,986$ und $Pi^- = Pi_o \cdot (1 - 0,986)$. Bei Einsetzen dieses Wertes und der Pikratkonzentration lautet obige Gleichung für K4:

$$K4 = \frac{1}{\left(\frac{1}{0,986} - 1 - K5\right) \cdot Pi_o \cdot (1 - 0,986)} \quad \text{(Gl. 9)}$$

Ist K5 bekannt, so ergibt sich aus dieser Gleichung K4, und damit kann dann mittels der o.a. Gleichung (Gl. 7) OH^-_{opt} bestimmt werden. Da der wahre Wert von K5 jedoch nicht zugänglich ist, wird K5 über die optimale OH^--Konzentration (Gl. 7) bestimmt, wobei die experimentell gefundenen Werte (0,073 - 0,09 mol/l) zu Grunde gelegt wurden.

Bei OH^-_{opt} = 0,073 mol/l beträgt K4 : $1,264 \cdot 10^6$ $mol^{-1}l$ und K5 : $1,645 \cdot 10^{-3}$ $mol^{-1}l$.

Bei OH^-_{opt} = 0,09 mol/l beträgt K4 : $1,214 \cdot 10^6$ $mol^{-1}l$ und K5: $1,124 \cdot 10^{-3}$ $mol^{-1}l$.

Wie theoretisch zu erwarten sind die Werte für K5 ($1,64 \cdot 10^{-3}$ $mol^{-1}l$) und K2A($2,5 \cdot 10^{-3}$ $mol^{-1}l$) ähnlich.

Die Differenz zwischen K5 und K2A ist darauf zurückzuführen, daß die Gerätequalität nicht ausreicht, alle erforderlichen Konstanten mit der benötigten Genauigkeit zu bestimmen. Um die optimalen Reaktionsbedingungen rechnerisch zu erfassen, sind ergänzende kinetische Untersuchungen und eine empirische Variation der Konzentrationen erforderlich.

In dem von uns gefundenen optimalen NaOH-Konzentrationsbereich für die Jaffé-Reaktion beträgt der pH im Meßansatz 12,86 - 12,95; dieser Wert entspricht ungefähr dem pK_a-Wert (12,7) der Methylengruppe des Kreatinins. Bei der optimalen NaOH-Konzentration (0,073 - 0,09 mol/l) liegen ca. 59 - 65 % des Kreatinins als Kreatininat vor. Bei 400 mmol/l NaOH sind ca. 88,8 % des Kreatinins in Kreatininat überführt (s. Tab. XVII). Dies verdeutlicht, daß die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei steigender Basenkonzentration u.a. auf die vermehrte Bereitstellung von Kreatininat zurückzuführen ist. Die Jaffé-Reaktion läuft bereits bei einer Kreatininat-Konzentration von 1 % ab.

8.2. DIE KREATININBESTIMMUNG IN DER PERILYMPHE

In der Perilymphe ist eine mittlere Kreatininkonzentration von 67 µmol/l zu erwarten, so daß bei einer Probe von 3 - 5 µl und einem Küvettenvolumen von 15 µl die Kreatininkonzentration im Meßansatz ca. 13,4 - 22,3 µmol/l beträgt. Um optimale Reaktionsbedingungen für die Jaffé-Reaktion zu erhalten, werden bei dieser Kreatininmenge im Meßansatz eine Pikratkonzentration von mindestens 3,75 mmol/l und eine NaOH-Konzentration von 73 - 90 mmol/l benötigt. Damit ergibt sich für die quantitative Bestimmung des Kreatinins in 3 - 5 µl Perilymphe folgende Arbeitsvorschrift:

3(5) µl Perilymphe werden mit Hexafluorisopropanol (HFIP) enteiweißt. Es werden 0,5 µl HFIP/µl Perilymphe zugesetzt und mit der Perilymphe gut vermischt, Nach Abzentrifugieren wird der Zentrifugat-Überstand in Kapillarröhrchen (Gesamtvolumen mindestens 20 µl) langsam im Vakuum getrocknet. Die getrocknete Probe wird anschließend mit 15 µl alkalischer Pikratlösung versetzt, die vor jeder Meßreihe frisch angesetzt werden sollte.

Herstellung der alkalischen Pikratlösung:

5 ml wässrige Pikratlösung (9 mmol/l) werden mit 5 ml NaOH (0,155 mol/l) versetzt. Nach Zugabe der vortemperierten Pikratlösung zur Probe Temperierung des Meßansatzes bei 25°C. Die Messung der Extinktion erfolgt 80 Min. nach Start der Reaktion in einer thermostatisierten Durchfluß-Mikroküvette (Gesamtvolumen 15 µl; Schichtdicke 1 cm) bei einer Wellenlänge von 486 nm.

Bei älteren Meßgeräten (Röhrengeräten) sollte die Einstellung der Wellenlänge mit einer Eichküvette (Schichtdicke 1 cm) erfolgen, wobei Kaliumchromat (62,69 mmol/l) für diesen Wellenlängenbereich als Eichlösung am günstigsten ist. Die Eichlösung muß ebenfalls temperiert sein.

Durch die Messung bei optimalen Reaktionsbedingungen wird zwar eine deutliche Steigerung der Empfindlichkeit sowie eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht, entscheidend für die Kreatininbestimmung mit der Jaffé-Reaktion in einem derartig kleinen Probevolumen ist jedoch die Verwendung des leicht flüchtigen Hexafluorisopropanol als Enteiweißungsmittel. Beim Abdunsten des Fällungsmittels nach der Enteiweißung können durch längeres Evakuieren zusätzlich noch die leichter flüchtigen Bestandteile der Probe entfernt werden, so daß das Volumen des Meßansatzes sehr klein gehalten werden kann.

Bei der Kreatininbestimmung in biologischen Flüssigkeiten ohne vorherige Abtrennung der Störsubstanzen liegt das Hauptproblem in dem kontinuierlichen Anstieg der Extinktion, der auf die Mitreaktion der Chromogene zurückzuführen ist und die Bestimmung der maximalen Extinktion der Jaffé-Reaktion erheblich erschwert. Die Höhe des Chromogenanteils an der Gesamtabsorption ist sehr stark von dem Meßzeitpunkt abhängig, da die Geschwindigkeit der Umsetzung mit alkalischer Pikratlösung bei den meisten Störsubstanzen geringer ist als bei Kreatinin. Daher muß der Meßzeitpunkt für die jeweiligen Reaktionsbedingungen durch vorausgehende Untersuchungen mit einer wässrigen Kreatininstandardlösung festgelegt und so früh wie möglich gewählt werden.

Neben dem Meßzeitpunkt hat die Temperatur (Reaktions- und Meßtemperatur) wesentlichen Einfluß auf die Reproduzierbarkeit der Meßwerte. Einerseits ist die Lage der Absorptionsbanden des Pikrates und seiner Addukte von der Meßtemperatur abhängig, andererseits wird die Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeit des Jaffé-Adduktes und der Chromogen-Addukte sehr stark von der Reaktionstemperatur beeinflußt. Die Reaktions- und Meßtemperatur sollte so niedrig wie möglich sein, da dann der Pikratuntergrund relativ klein bleibt, die

Stabilität des Jaffé-Adduktes zunimmt und die Nebenreaktionen langsamer ablaufen. Eine zu starke Temperatursenkung kann jedoch zu einer Abnahme des Extinktionskoeffizienten der Jaffé-Reaktion und damit zu einer Reduzierung der Empfindlichkeit führen. Für die Kreatininbestimmung durch die Jaffé-Reaktion mit dem Endpunktverfahren ist eine Reaktionstemperatur von 20°C bis 25°C am günstigsten.

8.3. DIE MESSGENAUIGKEIT

Bei der Kreatininbestimmung nach der hier entwickelten Methode sind folgende Grundbedingungen für eine gute Reproduzierbarkeit der Meßwerte Voraussetzung:

1. Das zur Enteiweißung verwendete HFIP muß vor Zugabe der alkalischen Pikratlösung völlig abgedunstet sein;
2. Die Reaktions- und Meßbedingungen (Pikrat-, OH^--Konzentration, Reaktions- und Meßtemperatur, Meßzeitpunkt) müssen bei allen Proben identisch sein;
3. Im Verlauf einer Meßreihe sollte jegliche Temperaturschwankung am Gerät vermieden werden;
4. Die Einstellung der Meßwellenlänge muß mit größter Präzision durchgeführt werden, da die Messungen in einem Bereich erfolgen, in dem $dE/d\lambda$ extrem groß ist.

Mit dem hier gewählten Reaktionsansatz wird bei 486 nm ein Extinktionskoeffizient von $1,27 \cdot 10^7\ cm^2 mol^{-1}$ erhalten, wobei eine ausreichend lineare Beziehung zwischen Kreatininkonzentration und Extinktion besteht. Bei einem Probevolumen von 3 µl, einer Kreatininkonzentration von 42 µmol/l - sie entspricht weitgehend dem unteren Grenzwert des für die Perilymphe angenommenen Normbereiches für den Kreatiningehalt (Normalbereich im Serum: 67 ± 25 µmol/l (292)) - und einem Gesamtvolumen des Meßansatzes von 15 µl wird mit diesem Extinktions-

koeffizienten eine Gesamtextinktion von 0.106 erhalten. Dieser Wert liegt weit über der unteren Nachweisgrenze. Daher kann die hier angestrebte Kreatininbestimmung mit der Jaffé-Reaktion in 3 - 5 µl Perilymphe mit ausreichender Genauigkeit durchgeführt werden.

Nach KAYSER (157) wird die Nachweisgrenze aus der dreifachen Standardabweichung des Mittelwertes der Streuung der Reagenzienleerwerte der Serie bestimmt.

Bei der mikroanalytischen Bestimmung des Kreatinins stellt sich jedoch weniger die Frage nach der Nachweisgrenze, als nach der Meßgenauigkeit. In der Regel wird diese Frage durch die Streuung der Analyseneichfunktion beantwortet. In dem vorliegenden Fall gilt dies nur näherungsweise, da bei der Kreatininbestimmung in biologischen Flüssigkeiten, je nach Probe, verschiedene Störsubstanzen ("Jaffé-Chromogene") die Observable geringgradig beeinflussen. Diese Störungen sind systematischer Art und werden von der Analyseneichfunktion nicht erfaßt. Durch Wahl einer geeigneten Meßwellenlänge, einer günstigen Konzentration der Reaktanten Pikrat und NaOH sowie einer entsprechenden Reaktionstemperatur und -zeit können diese Fehlerquellen zwar erheblich reduziert, jedoch nicht völlig beseitigt werden.

Um eine Aussage über die zu erwartende Genauigkeit bei der Bestimmung der Kreatininkonzentration nach der hier entwickelten Methode unter den Verhältnissen einer Mikrobestimmung zu erhalten, wurde der Toleranzbereich der Einzelmessung bestimmt. Hierbei wurde unterstellt, daß die Analyseneichfunktion, die mit wässrigen Kreatinin-Standardlösungen erhalten wurde, die Meßfehler in erster Näherung richtig beschreibt und für den begrenzten Meßbereich eine Gerade ist. Die Bestimmung erfolgte in Anlehnung an die für den Toleranzbereich der Einzelmessung angegebene Gleichung (88), wobei folgende Größen eingesetzt wurden:

$C_{Kr,Pr}$ = Kreatininkonz. der Probe (x)

$\bar{C}_{Kr,Eich}$ = mittlere Kreatininkonz., aus der Analysen-eichfunktion (Eich.) ermittelt ($\bar{x}$)

$b_{E,Kr,Eich}$ = Steigung der Eichgeraden (bxy)

E_{Pr} = Extinktion der Probe (y)

$\bar{E}_{Eich}$ = mittlere Extinktion der Probe, aus der Analysen-eichfunktion ermittelt ($\bar{y}$)

k = Toleranzfaktor = $\dfrac{t_{2\alpha} \cdot S_{bE,Kr,Eich}}{b_{E,Kr,Eich}}$

$S_{Kr,Eich}$ = (n-1)fache Varianz der Kreatinin-Eichwerte

$$C_{Kr,Pr} = \bar{C}_{Kr,Eich} + \frac{E_{Pr} - \bar{E}_{Eich}}{b_{E,Kr,Eich} \cdot (1-k^2)} \pm \frac{k}{b_{E,Kr,Eich} \cdot (1-k^2)} \cdot \sqrt{\left(\frac{n+1}{n}\right) b^2_{E,Kr,Eich} \cdot (1-k^2) \cdot S_{Kr} + (E_{Pr} - \bar{E}_{Eich})^2}$$

Zur Überprüfung der Genauigkeit bei der Kreatininbestimmung mit der hier entwickelten Methode wurde eine Meßserie (n = 26) im Mikroansatz mit 5 µl Serum durchgeführt. Läßt man eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 2,5 % (t = 2,37) zu, so ergibt sich bei einer mittleren Kreatininkonzentration von 85,8 µmol/l (s = 12,69 µmol/l) für die Einzelmessung eine mittlere Toleranzgrenze von 3,15 µmol/l.

Wesentlich größer als der zu erwartende Meßfehler ist der systematische Fehler, der auf die Interferenz der Störsubstanzen zurückzuführen ist. Bei den von uns für die Ultra-Mikrobestimmung gewählten Reaktions- und Meßbedingungen beträgt der mittlere Anteil der Chromogenabsorption an der Gesamtabsorption bei einer Reaktionstempe-

ratur von 25°C ca. 12,6%, wobei der Glucose mit einem Anteil von 6,8 % die Hauptbedeutung zukommt. Eine weitere Reduzierung des systematischen Fehlers ist zwar durch Änderung der Meß- und Reaktionsbedingungen möglich, jedoch kommt es dann auch gleichzeitig zu einer deutlichen Abnahme des Extinktionskoeffizienten der Jaffé-Reaktion.

Die in der Literatur z.T angegebenen höheren Werte für den Anteil der Störsubstanzen an der Gesamtabsorption sind nach den hier gewonnenen Erkenntnissen hauptsächlich auf methodische Fehler zurückzuführen, die teils auf der pH-Differenz zwischen Standard und Probe, teils auf der Unterbewertung des Einflusses der Basenkonzentration, der Reaktionstemperatur und Reaktionszeit sowie der Meßtemperatur auf die Gesamtextinktion des Meßansatzes beruhen.

9. ZUSAMMENFASSUNG

Da die zahlreichen Verfahren, die zur Kreatininbestimmung angewendet werden, teils wegen ihrer geringen Empfindlichkeit, teils wegen ihrer umständlichen Durchführung für die Kreatininbestimmung in 3 - 5 µl Perilymphe ungeeignet sind, werden die Bedingungen für die Anwendung der Jaffé-Methode im Ultra-Mikrobereich ermittelt. Zum Verständnis der Jaffé-Reaktion werden zuerst das Verhalten der Reaktanten Kreatinin und Pikrat in alkalischem Milieu sowie der Reaktionsmechanismus der Jaffé-Reaktion untersucht.

Kreatinin geht bei OH^--Zugabe in Kreatininat (K3 = 1098,7) über, wobei der Kreatininat-Anteil dem Gleichgewicht entsprechend von der Basenkonzentration abhängig ist. Pikrat lagert kovalent OH^--Ionen an, wobei je nach Basenkonzentration entweder überwiegend Mono- (K1 = $8 \cdot 10^{-2}$ $mol^{-1}l$) oder Diaddukte (K2 = $2,5 \cdot 10^{-3}$ $mol^{-1}l$) entstehen. Das primäre Reaktionsprodukt der Jaffé-Reaktion (K4 = $1,26 \cdot 10^{6}$ $mol^{-1}l$) konnte aus einem methanolischen Reaktionsansatz in weitgehend reiner Form isoliert werden. Es ist ein anionischer σ-Komplex, bei dem Kreatininat kovalent an ein unsubstituiertes Ring-C-Atom des Pikrates angelagert ist. Der Diaddukt-Anteil (K5 = $1,64 \cdot 10^{-3}$ $mol^{-1}l$) ist hier relativ gering.

Die Untersuchung des Einflusses der Reaktions- und Meßbedingungen auf den Extinktionskoeffizienten, die teils an einem Reaktionsansatz mit wässrigem Kreatininstandard, teils an dem isolierten Jaffé-Addukt durchgeführt wurde, ergab, daß folgende Reaktionsbedingungen für den Mikroansatz (3 - 5 µl Probe) hinsichtlich Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit am günstigsten sind:
Pikrat: 3,75 mmol/l; NaOH: 70 - 90 mmol/l; Reaktions- und Meßtemperatur: 20 - 25°C.

Die OH^--Konzentration hat den stärksten Einfluß auf den Extinktionskoeffizienten, der je nach Meßtemperatur zwischen 482 und 486 nm am größten ist. Bei 486 nm beträgt er bei 25°C $1,27 \cdot 10^7$ $cm^2 mol^{-1}$. Um den Einfluß der sog. "Jaffé-Chromogene" auf die Kreatininbestimmung zu beurteilen, wurde die Umsetzung der wichtigsten interferierenden Verbindungen mit alkalischer Pikratlösung untersucht. Die Mitreaktion beruht bei den verschiedenen Substanzen auf unterschiedlichen Reaktionsmechanismen. Durch eine niedrige Reaktionstemperatur und einen günstigen Meßzeitpunkt kann bei den meisten Chromogenen das Ausmaß der Interferenz reduziert werden. Der mittlere Chromógenanteil an der Gesamtabsorption beträgt bei der hier entwickelten Bestimmungsmethode 7,6 - 17,7 %. Glucose hat aufgrund ihrer Konzentration die größte Bedeutung unter den Chromogenen.

Durch Einführung von Hexafluorisopropanol zur Proteinfällung wird es möglich, die Kreatininbestimmung in Proben von 3-5 µl problemlos durchzuführen. Die Meßgenauigkeit und Empfindlichkeit des hier entwickelten Verfahrens ist für die Kreatininbestimmung in der Perilymphe ausreichend. Der Toleranzbereich der Einzelmessung beträgt bei einer mittleren Kreatininkonzentration von 85,8 µmol/l bei 5 µl Serum 3,15 µmol/l (t = 2,37).

Herrn Professor Dr. med. W. Kley danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die guten Arbeitsbedingungen, die mir in seiner Klinik gewährt wurden.

Herrn Dr. rer. nat. K. Schindler gilt mein besonderer Dank für die ständige Unterstützung und die vielen wertvollen Anregungen sowie für die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Untersuchungen.

Herrn Dr. rer. nat. W. Jung danke ich herzlich für seine nützlichen Ratschläge und für seine Unterstützung bei der Darstellung der verschiedenen, nicht im Handel erhältlichen Verbindungen.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ABE, T.

Substituent effects on the ultraviolet absorption spectrum of 1,3,5 - trinitrobenzene in some solvents

Bull. Chem. Soc. Japan, 32, 339-344 (1959)

2. ABE, T.

Interaction of picric acid with sodium hydroxide in water

Nature, 187, 234-235 (1960)

3. ACKER, L., W. DIEMAIR, D. PFEIL, G. SCHIFFNER

Die papierchromatographische Trennung von Kreatin und Kreatinin und die quantitative Bestimmung von Gesamtkreatinin in Lebensmitteln

Z. Anal. Chem., 148, 10-14 (1955)

4. ADAMS, W.S., F.W. DAVIS, L.E. HANSEN

New method for determination of creatinine in urine by ion exchange separation and ultraviolet spectrophotometry

Anal. Chem., 34, 854-856 (1962)

5. AKATSUKA, M., Y.SHIMOBAYASHI, H. MINATOGAWA

Über die Reaktion der Dinitroverbindungen auf aktiven Methylen-Gruppen (I. Ergänzung). Über die quantitative Bestimmung von einigen Arzneimitteln mit 3,5-Dinitrobenzolsulfonsäure

Kumamoto Pharm. Bull., 3, 83-85 (1958)

6. ALLINSON, M.J.C.

A specific enzymatic method for the determination of creatine and creatinine in blood

J. Biol. Chem., 157, 169-172 (1945)

7. ANSLOW, W.K., H. KING

The constitution of the red isomeride of creatinine picrate responsible for Jaffé's colour reaction

J. Chem. Soc. 131, 1210-1216 (1929)

8. ARCHIBALD, R.M.

Reactions of creatinine with alkaline picrate

J. Biol. Chem., 237, 612 (1962)

9. BALASUBRAMANIAN, D., R.S. ROCHE

Novel solvent systems for the study of conformational transitions in synthetic polypeptides

Polym. Prep., Amer. Chem. Soc., Div. Polym. Chem., 11, 127-131 (1970)

1o. BARCLAY, J.A., R.A. KENNEY
A method for the estimation of creatinine
Biochem. J., 41, 586-589 (1947)

11. BARTELS, H., M. CIKES
Über Chromogene der Kreatininbestimmung nach Jaffé
Clin. Chim. Acta, 26, 1-1o (1969)

12. BARTELS, H., M. BÖHMER
Eine Mikromethode zur Kreatininbestimmung
Clin. Chim. Acta, 32, 81-85 (1971)

13. BARTELS, H., M. BÖHMER, C. HEIERLI
Serum Kreatininbestimmung ohne Enteiweißen
Clin. Chim. Acta, 37, 193-197 (1972)

14. BARTELS, H., M. BÖHMER
Eine kinetische Meßmethode für Serumkreatinin
Med. Laborat., 26, 2o9-215 (1973)

15. BEHRE, J.A., S.R. BENEDICT
Studies in creatine and creatinine metabolism.
IV. On the question of the occurrence of creatinine and creatine in blood.
J. Biol. Chem. 52, 11-33 (1922)

16. BEILSTEINS Handbuch der organischen Chemie, II. Ergänzungswerk;
Syst. Nr. 3587; 24, S. 128-131; Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954

17. BENEDICT, S.R., J.A. BEHRE
Some applications of a new color reaction for creatinine
J. Biol. Chem., 114, 515-532 (1936)

18. BERGMEYER, H.U., H. MOELLERING
Enzymatische Bestimmung von Acetat
Biochem. Z., 344, 167-189 (1966)

19. BERGMEYER, H.U., E. BERNT, K. GAWEHN, G. MICHEL
In: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl.,
Hrsg. H.U. Bergmeyer, S. 167-188; Weinheim/Bergstr.: Verl. Chemie 1974

2o. BERLET, H.H., A. VÖLKL
Die Ultraviolett-Absorption von Kreatinin und Glykocyamidin im Vergleich mit anderen Guanidinverbindungen und analogen Hydantoinen
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 13, 53-59 (1975)

21. BERNASCONI, C.F.

Intermediates in nucleophilic aromatic substitution.
IV.Kinetic study of the interaction of 1,3,5-trinitrobenzene with the lyate ions of water, methanol, and ethanol in the respective solvents

J. Amer. Chem. Soc., 92, 4682-4688 (197o)

22. BERNASCONI, C.F.

Mechanisms and reactivity in aromatic nucleophilic substitution reactions

Internat. Rev. Sci.; Org. Chem. Ser. 1, 3, 33-63 (1973)

23. BEVILL, R. D., R.J. LOEFFLER, W. WILSON

Direct determination of serum creatinine utilizing Vickers D-3oo discrete reaction analyzer

Clin. Chem., 18, 688 (1972)

24. BEYERMANN, K.

Die Bestimmung des Kreatinins in Serum und Harn

Z. Anal. Chem., 2o5, 416-438 (1964)

25. BEYERMANN, K., W. GEROK, U. GROTH

Zur Präzisierung der Kreatininbestimmung. Vergleich verschiedener Bestimmungsverfahren

Klin. Wochenschr. 45, 95o-953 (1967)

26. BEYERMANN, K.

Zur Präzisierung der Kreatininbestimmung

Clin. Chim. Acta, 17, 47-52 (1967)

27. BEYERMANN, K., H. WISSER

Bestimmung von Guanidin, Methylguanidin und asymmetrischem Dimethylguanidin in menschlichem Serum. I. Bestimmung durch Dünnschicht-Chromatographie und anschließende Fluorimetrie

Z. Anal. Chem., 245, 311-319 (1969)

28. BIELIK, E., G. GUSTAFIKOVA

Über eine von Momose und Mukai angegebene Methode zur Kreatininbestimmung

Clin. Chim. Acta, 14, 767-77o (1966)

29. BIGGS, H.G., J.M. COOPER

Modified Folin methods for the measurement of urinary creatine and creatinine

Clin. Chem., 7, 655-664 (1961)

3o. BJÖRKHEM, I., R. BLOMSTRAND, G. ÖHMAN

Mass fragmentography of creatinine proposed as a reference method

Clin. Chem., 23, 2114-2121 (1977)

31. BLASS, K.G., R.J. THIBERT

Inverse polarographic determination of creatinine with alkaline picrate and 3,5-dinitrosalicylic acid

Microchem. J., 19, 1-7 (1974)

32. BLASS, K.G., R.J. THIBERT, L.K. LAM

A study of the mechanism of the Jaffé reaction

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 12, 336-343 (1974)

33. BLAU, N.F.

The estimation of creatinine in the presence of acetone and diacetic acid

J. Biol. Chem., 48, 1o5-118 (1921)

34. BLENNEMANN, H.

Automatisierte Serumkreatinin-Bestimmung ohne Enteiweißung

Ärztl. Lab., 17, 363-368 (1971)

35. BLOCH, K., R. SCHOENHEIMER

The biological precursors of creatine

J. Biol. Chem., 138, 167-193 (1941)

36. BÖRNER, U., F. STAEHLER, K. STINSHOFF, G. SZASZ

Evaluation of an enzymatic method for creatinine

Z. Anal. Chem., 279, 171 (1976)

37. BOLLIGER, A.

The colorimetric determination of creatinine in urine and blood with 3,5-dinitrobenzoic acid

Med. J. Aust., 2, 818-821 (1936)

38. BOLLIGER, A.

On the chemistry of Jaffé's reaction for creatinine

J. Proc. Roy. Soc. N.S. Wales, 7o, 357-363 (1937)

39. BOLLIGER, A.

Red compounds formed by picric acid and creatinine in the presence of sodium hydroxide

J. Proc., Roy. Soc. N.S. Wales, 71, 6o-67 (1937)

4o. BOLLIGER, A.

On the chemistry of the reaction of creatinine with 3,5-dinitrobenzoic acid

J. Proc. Roy. Soc. N.S. Wales, 71, 223-229 (1938)

41. BONSNES, R.W., H.H. TAUSSKY

On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffé reaction

J. Biol. Chem., 158, 581-591 (1945)

42. BORSOOK, H., J.W. DUBNOFF

The formation of glycocyamine in animal tissues

J. Biol. Chem., 138, 389-4o3 (1941)

43. BORSOOK, H., J.W. DUBNOFF

The hydrolysis of phosphocreatine and the origin of urinary creatinine

J. Biol. Chem., 168, 493-51o (1947)

44. BORSOOK, H., J.W. DUBNOFF

On the role of the oxidation in the methylation of guanidinoacetic acid

J. Biol. Chem., 171, 363-375 (1947)

45. BRIDDON, A.

The manual and automated determination of creatinine on small volumes of plasma

Med. Lab. Technol., 3o, 335-34o (1973)

46. BROD, J., J.H. SIROTA

The renal clearance of endogenous "creatinine" in man

J. Clin. Invest., 27, 645-655 (1948)

47. BROWN, N.D., H.C. SING, W.E. NEELEY, S.E. KOETITZ

Determination of "true" serum creatinine by high-performance liquid chromatography combined with a continuous-flow microanalyzer

Clin. Chem., 23, 1281-1283 (1977)

48. BUCK, P.

Reaktionen aromatischer Nitroverbindungen mit Basen

Angew. Chem., 81, 136-148 (1969)

49. BUTLER, A.R.

The Jaffé reaction. Identification of the coloured species

Clin. Chim. Acta, 59, 227-232 (1975)

5o. BUTLER, A.R.

The Jaffé reaction. Part II. A kinetic study of the Janovsky complexes formed from creatinine (2-imino-1-methylimazolidin-4-one) and acetone

J. Chem. Soc. Perkin Trans II, 853-857 (1975)

51. BUTLER, A.R.

Jaffé reaction mechanism debated

Clin. Chem., 23, 613-614 (1977)

52. CAMARA, A.A., K.D. ARN, A. REIMER, L.H. NEWBURGH

The twenty-four hourly endogenous creatinine clearance as a clinical measure of the functional state of the kidneys

J. Lab. Clin. Med., 37, 743-763 (1951)

53. CANCALON, P.,J.D. KLINGMAN

Simultaneous determination of biogenic and non-biogenic amines by gas liquid chromatography

J. Chromatogr. Sci., 1o, 253-256 (1972)

54. CANNAN, R.K., A. SHORE

The creatine-creatinine equilibrium. The apparent dissociation constants of creatine and creatinine

Biochem. J., 22, 92o-929 (1928)

55. CANTONI, G.L., P.J. VIGNOS

Enzymatic mechanism of creatine synthesis

J. Biol. Chem., 2o9, 647-659 (1954)

56. CARAWAY, W.T., C.W. KAMMEYER

Chemical interference by drugs and other substances with clinical laboratory test procedures

Clin. Chim. Acta, 41, 395-434 (1972)

57. CARISANO, A., A. BONECCHI, M. RIVA

Determination of creatinine in soups and soup preparations by ion-exchange chromatography

J. Chromatogr., 45, 264-268 (1969)

58. CARR, J.J.

Reactions of aromatic nitro compounds with active methyl, methylene, methine groups in presence of base. Determination of creatinine with alkaline 3,5-dinitrobenzoate

Anal. Chem., 25, 1859-1863 (1953)

59. CAVENG, P., P.B. FISCHER, E. HEILBRONNER, A.L. MILLER, H. ZOLLINGER

Magnetische Kernresonanz- und "Molecular Orbital"-Untersuchungen über die Struktur von Meisenheimer-Komplexen

Helv. Chim. Acta, 5o, 848-86o (1967)

6o. CHAPMAN, A.C.

On Jaffè's colorimetric method for the estimation of creatinine

Analyst, 34, 475-483 (19o9)

61. CHASSON, A.L., H.J. GRADY, M.A. STANLEY

Determination of creatinine by means of automatic chemical analysis

Amer. J. Clin. Pathol., 35, 83-88 (1961)

62. CHAZERAIN, M.J.

Dosage spécifique de la créatinine et de la créatine par la réaction de Sakaguchi aprés oxydation par le réactif de Nessler

Ann. Pharm. Fr.,16, 413-421 (1958)

63. CHEN, S.-P., S.S. KUAN, G.G. GUILBAULT

Fluorometric enzymatic determination of serum creatinine on the surface of silicone-rubber pads

Clin. Chim. Acta. 1oo, 21-31 (198o)

64. CHEVREUL, M.

Recherches sur la composition chimique du bouillon de viande (extrait d'un rapport sur le bouillon de la compagnie hollandaise fait à l'Academie des Sciences par M. Chevreul le 19 mars, 1832)

J. prakt. Chem., 6, 12o-13o (1835)

65. CHIOU, W.L., F.H. HSU

Pharmacokinetics of creatinine in man and its implications in the monitoring of renal function and in dosage regimen modifications in patients with renal insufficiency

J. Clin. Pharmacol, 15, 427-434 (1975)

66. CHIOU, W.L., M.A.F. GADALLA, G.W. PENG

Simple, rapid, and micro high-pressure liquid chromatographic determination of endogenous "true" creatinine in plasma, serum, and urine

J. Pharm. Sci., 67, 182-187 (1978)

67. CHIOU, W.L., G.W. PENG, M.A.F. GADALLA, S.T. NERENBERG

Comparison of plasma creatinine levels in patients determined by high-pressure liquid chromatography, automated analysis, and boiling alkaline picrate method

J. Pharm. Sci., 67, 292-293 (1978)

68. CHIOU, W.L.

Creatinine IX. Specifity and sensitivity of high-performance liquid chromatographic and ion-exchange membrane methods for determination of endogenous creatinine

J. Pharm. Sci., 68, 8o2-8o3 (1979)

69. CLARK, L. C. Jr., H.L. THOMPSON

Determination of creatine and creatinine in urine

Anal. Chem., 21, 1218-1221 (1949)

7o. CLARKE, J.T.

Colorimetric determination and distribution of urinary creatinine and creatine

Clin. Chem., 7, 271-283 (1961)

71. CLOSE-MOLL, M., J.G. LINES

Some observations and improvements on SMA 6/6o determinations of creatinine

J. Clin. Path., 25, 6o3-6o5 (1972)

72. CLOTTEN, R., A. CLOTTEN

Hochspannungselektrophorese, S. 29o-294,

Stuttgart: Thieme 1962

73. COHEN, S.

The synthesis of creatine by preparations of liver from embryos and adults of various species

J. Biol. Chem., 193, 851-858 (1951)

74. COOK, J.G.H.

Creatinine assay in the presence of protein

Clin. Chim. Acta, 32, 485-486 (1971)

75. COOK, J.G.H.

Factors influencing the assay of creatinine

Ann. Clin. Biochem., 12, 219-232 (1975)

76. COOPER, J.M., H.G. BIGGS

An evaluation of four methods of measuring urinary creatinine

Clin. Chem. 7, 665-673 (1961)

77. COTTRELL, D.B., C.S. FRINGS

Evaluation of Beckman Creatinine Analyzer 2

Clin. Chem., 24, 1o62 (1978)

78. CRAMPTON, M.R., V.GOLD

Reactions of aromatic nitro-compounds in alkaline media. Part. X. The relationship between hydrogen exchange and colour formation in m-dinitrobenzene and related compounds

J. Chem. Soc. (B), Phys. Org., 498-5o3 (1966)

79. CRAMPTON, M.R., V. GOLD

Reactions of aromatic nitro-compounds in alkaline media. Part XI. Structural investigations by proton magnetic resonance spectroskopy

J. Chem. Soc. (B) Phys. Org., 893-9oo (1966)

8o. CRAMPTON, M.R.

Meisenheimer Complexes

Advan. Phys. Org. Chem., 7, 211-257 (1969)

81. CRAMPTON, M.R., M.EL-GHARIANI

Interactions of picric acid with aqueous sodium sulphite and with sodium hydroxide

J. Chem. Soc. (B), 33o-333 (1969)

82. CRAMPTON, M.R.

The stabilities of Meisenheimer complexes. Part. 15. The interactions of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonate ions with sodium sulphite and with sodium hydroxide in water

J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 343-346 (1978)

83. DANIELSON, I. S.

On the presence of creatinine in blood

J. Biol. Chem. 113, 181-195 (1936)

84. DAUGHERTY, N.A., K.B. HAMMOND, I.M. OSBERG

Bilirubin interference with the kinetic Jaffé method for serum creatinine

Clin. Chem., 24, 392-393 (1978)

85. DE HAAN, J.B.

Creatinine in serum and plasma. Direct microdetermination by kinetics

Anal. Lett., 5, 815-827 (1972)

86. DENNIG, D., O. MÜLLER-PLATHE

Zur Methodik der Kreatininbestimmung im Serum

Dtsch.Med. Wochenschr., 97, 1751-1754 (1972)

87. DIAMANDIS, E.P., M.A. KOUPPARIS, T.P. HADJIIOANNOU

Kinetic potentiometric determination of creatinine in urine with a picrate-ion-selective electrode

Microchem. J., 22, 498-5o4 (1977)

88. DOCUMENTA GEIGY

Wissenschaftliche Tabellen. 7. Aufl., Basel 1969

89. DUBACH, U.C., I. METZ, P. SCHMID

Serum-Kreatininwerte bei 2258 arbeitstätigen Personen verschiedenen Alters und Geschlechts

Klin. Wochenschr., 45, 621-629 (1967)

9o. DUNICZ, B.L.

Simple and accurate method for the determination of creatine and creatinine

Clin. Chim. Acta, 9, 2o3-2o9 (1964)

91. EDWARDS, K.D.G., H.M. WHYTE

The measurement of creatinine in plasma and urine Austral. J. Exp. Biol., 36,383-394 (1958)

92. ELLINGER, A., R. SEIDEL, K.-A. KOVAR

Zum Mechanismus der Jaffé-Reatkion auf Kreatinin

Arch. Pharm., 3o9, 6o3-6o6 (1976)

93. FABINY, D.L., G. ERTINGSHAUSEN

Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifiChem

Clin. Chem., 17, 696-7oo (1971)

94. FARESE, G., M. MAGER

Protein-free filtrates obtained by membrane ultra-filtration. Application to the determination of serum constituents

Clin. Chem., 16, 28o-281 (197o)

95. FITCH, C.D., D.D. LUCY, J.H. BORNHOFEN, G.V. DALRYMPLE

Creatine metabolism in skeletal muscle
II. Creatine kinetics in man

Neurology, 18, 32-42 (1968)

96. FOLIN, O.

Beitrag zur Chemie des Kreatinins und Kreatins im Harne

Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 41, 223-242 (19o4)

97. FOLIN, O.

On the determination of creatinine and creatine in blood, milk and tissues

J. Biol. Chem., 17, 475-481 (1914)

98. FONTY, P., J. DRUEL

Dosage de la créatinine sérique et urinaire cléarance de la créatinine utilisation practique des résultats obtenus

Feuill. Biol. 15, 91-97 (1974)

99. GAEBLER, O.H., A.K. KELTCH

On the nature of blood creatinine

J. Biol. Chem., 76, 337-359 (1928)

1oo. GAEBLER, O.H.

Further studies of blood creatinine

J. Biol. Chem., 89, 451-466 (193o)

101. GARNER, R.J.

Determination of creatinine

Nature, 170, 460-641 (1952)

102. GERBER, G.B., G. GERBER, T.R. KOSZALKA, L.L. MILLER

The rate of cratine synthesis in the isolated, perfused rat liver

J. Biol. Chem., 237, 2246-2250 (1962)

103. GIBSON, B., M. R. CRAMPTON

The stabilities of Meisenheimer complexes. Part 17. The reactions of 1-X-2,4,6-trinitrobenzenes with hydroxide ions in water

J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 648-652 (1979)

104. GOLD, V., C.H. ROCHESTER

Reactions of aromatic nitro-compounds in alkaline media. Part. VII. Behaviour of picric acid and of two dihydroxydinitrobenzenes in aqueous sodium hydroxide

J. Chem. Soc., 1722-1727 (1964)

105. GOLDMAN, R., J.X. MOSS

Synthesis of creatine in nephrectomized rats

Amer. J. Physiol., 197, 865-868 (1959)

106. GOLDMAN, R., J.X. MOSS

Creatine synthesis after cratinine loading and after nephrectomy

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 105, 450-453 (1960)

107. GRAFNETTER, D., Z.JANOSOVA, I. CERVINKOVA

I. Note on Slot's method for the specific determination of creatinine

Clin. Chim. Acta. 17, 493-498 (1967)

108. GRAHAM, G., E.P. POULTON

The alleged excretion of creatine in carbohydrate starvation

Proc. Roy. Soc. B., 87, 205-220 (1914)

109. GREENWALD, I., G. McGUIRE

The estimation of creatinine and of creatine in the blood

J. Biol. Chem. 34, 103-118 (1918)

110. GREENWALD, I., J. GROSS

The chemistry of Jaffé's reaction for creatinine. A red tautomer of creatinine picrate

J. Biol. Chem., 59, 601-611 (1924)

111. GREENWALD, I.

The chemistry of Jaffé's reaction for creatinine. II. The effect of substitution in the creatinine molecule and a possible formula for the red tautomer

J. Amer. Chem. Soc., 47, 1443-1448 (1925)

112. GREENWALD, I.

The chemistry of Jaffé's reaction for creatinine. III. 2,6-dinitrophenol

J. Amer. Chem. Soc., 47, 262o (1925)

113. GREENWALD, I.

The chemistry of Jaffé's reaction for creatinine. IV. A compound of creatinine,picric acid, and sodium hydroxide

J. Biol. Chem., 77, 539-546 (1928)

114. GREENWALD, I.

The chemistry of Jaffé's reaction for creatinine. V. The isolation of the red compound

J. Biol. Chem., 8o, 1o3-1o6 (1928)

115. GREENWALD, I.

The chemistry of Jaffé's reaction for creatinine. VI. A compound of picric acid with two molecules of creatinine. Its combinations with acid and alkali

J. Biol. Chem., 86, 333-343 (193o)

116. GRISLER, R., E. CASTELNUOVO

Metodo diretto per la determinazione della creatinina nel siero

Quad. Sclavo Diagn., 6, 473-477 (197o)

117. GUGGENHEIM, M.

Die biogenen Amine.

4. Aufl., S. 353-4o8, Basel: Karger 1951

118. GRZYBOWSKI, A.K., S.P. DATTA

The ionisation constant of the protonated form of creatinine

J. Chem. Soc., 6o, 187-196 (1964)

119. HAHN, A., G.BARKAN

Über die gegenseitige Umwandlung von Kreatin und Kreatinin

Z.Biol., 72, 25-36 (192o)

12o. HALBAN, H.v., M.SEILER

Über die Stärke der Pikrinsäure

Helv. Chim. Acta, 21, 385-392 (1938)

121. HALLAUER, W., J. SCHIRMEISTER

Kreatinin - Physiologie und diagnostische Verwertbarkeit einer Stoffwechselschlacke

Therapiewoche, 23, 2758-2763 (1973)

122. HALLER, H., S.E. STRAUZENBERG

Ein Beitrag zur Methodik der Bestimmung von Biguaniden, Kreatinin und Kreatin im Harn

Ärztl. Forsch., 2o, 415-419 (1966)

123. HARE, R.S., K. HARE

Determination of creatinine in blood and urine

Fed. Proc., 8, 68 (1949)

124. HARE, R.S.

Endogenous creatinine in serum and urine

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 74, 148-151 (195o)

125. HAUGEN, H.N.

The determination of endogenous "creatinine" in plasma and urine

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 5, 48-57 (1953)

126. HAUGEN, H.N.

Glucose and acetone as sources of error in plasma "creatinine" determinations

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 6, 17-21 (1954)

127. HAURY, H.

Untersuchungen zur Bestimmung von Kreatinin im Serum

Ärztl. Lab., 11, 175-18o (1965)

128. HAURY, H.

Serum-Kreatininbestimmung ohne Eiweißfällung

Diagnostik, 5, 226-229 (1972)

129. HAYMAN, J.M., S.M. JOHNSTON, J.A. BENDER

On the presence of creatinine in blood

J. Biol. Chem., 1o8, 675-691 (1935)

13o. HEARN, D.J., M.H. McLEAN, O.R. FLORES

The evaluation of a new rate system for the determination of creatinine

Clin. Chem., 23, 1172-1173 (1977)

131. HEERSPINK, W., H.-G. EISENWIENER

Vergleichende Untersuchungen der Initial Rate Methode des CentrifiChem Systems mit der Frankonit-Methode zur Bestimmung des Kreatinins in Serum und Urin

Clin. Chim. Acta, 63, 317-322 (1975)

132. HEINEGARD, D., G. TIDERSTRÖM

Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method

Clin. Chim. Acta, 43, 3o5-31o (1973)

133. HEINTZ, W.

Über eine neue Säure im menschlichen Harn

Poggendorff's Ann. Phys. Chem., 62, 6o2-6o6 (1844)

134. HELGER, R., H. RINDFREY, J. HILGENFELDT

Eine Methode zur direkten Bestimmung des Creatinins in Serum und Harn ohne Enteiweißung nach einer modifizierten Jaffé-Methode

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 12, 344-349 (1974)

135. HENRY, R.J.

Clinical Chemistry; Principles and Technics.

S. 16o-172, New York: Harper & Row 1966

136. HOBERMANN, H.D., E.A. SIMS, J.H. PETERS

Creatine and Creatinine metabolism in the normal male adult studied with the aid of isotopic nitrogen

J. Biol. Chem., 172, 45-58 (1948)

137. HOFMANN, E., A. WÜNSCH

Verwendung von Nitro-prussidreagenz in der Papierchromatographie

Naturwissenschaften, 45, 338 (1958)

138. HORAKOVA, E., Z. KULENDA, A. LIBICKY

Eine einfache Methode zur Kreatininbestimmung

Z. Med. Labortechn., 11, 162-167 (197o)

139. HUNTER, A., W.R. CAMPBELL

The probable accuracy, in whole blood and plasma, of colorimetric determinations of creatinine and creatine

J. Biol. Chem., 32, 195-231 (1917)

14o. HUNTER, A.

Creatine and creatinine (Monographs on biochemistry) London, New York, Toronto: Longmans, Green and Co 1928

141. HUNTER, G.

Deproteinization of blood

Biochem. J., 62, 28 (1956)

142. HUNTER, G.

A method for deproteinization of blood and other body fluids

J. Clin. Pathol., 1o, 161-164(1957)

143. HUSDAN, H., A. RAPOPORT

Estimation of creatinine by the Jaffé reaction. A comparison of three methods

Clin. Chem., 14, 222-238 (1968)

144. ISHIDATE, M., T. SAKAGUCHI

Qualitative reaction of active methylene group. III. Reaction of m-dinitrobenzene and its derivatives

J. Pharm. Soc. Japan, 7o, 444-446 (195o)

145. IVES, D.J.G., P.G.N. MOSELEY

Picric acid in aqueous solution

J. Chem. Soc. (B), 757-761 (1966)

146. JACKS, E.H., H.H. HALLEY, E.P. LENNETTE

The effect of bilirubin on the direct kinetic determination of serum creatinine

Clin. Chem., 24, 1o22 (1978)

147. JACOBSSON, L., L. PAULSEN

Spectrophotometric determination of creatinine in alcoholic solution

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 7, 32-34 (1955)

148. JAFFE, M.

Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins

Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 1o, 391-4oo (1886)

149. JONES, J.D., P.C. BURNETT

Creatinine metabolism in humans with decreased renal function: creatinine deficit

Clin. Chem., 2o, 12o4-1212 (1974)

15o. JOSEFSOHN, M., J.M. HICKS, S. LEWIS

An evaluation of the Beckman Creatinine Analyzer 2

Clin. Chem., 24, 1o63 (1978)

151. JUNG, W.

Results in evaluating cochlear kinetics of carbon-14 labeled metabolits

Rev. Laryngol. Otol. Rhinol., 1oo, 2o7-214 (1979)

152. KABEYA, T., K.KOHASHI, Y. OHKURA, T. MOMOSE

Mechanism of the color reaction of active methylene compounds with 1,3,5-trinitrobenzene derivatives. IV. Color reaction of picric acid and acetone under the Janovsky conditions

Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 21, 2168-2174 (1973)

153. KABEYA, T., K. KOHASHI, Y. OHKURA

Mechanism of the color reaction of active methylene compounds with 1,3,5-trinitrobenzene derivatives. VI. A protonated species of the Meisenheimer type compound derived from picric acid and acetone

Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 22, 711-714 (1974)

154. KAISER, H.

Zum Problem der Nachweisgrenze

Z. Anal. Chem., 209, 1-18 (1965)

155. KAMMERAAT, C.

Modification of the alkaline picrate assay for creatinine to prevent spuriously elevated values by keto acids

Clin. Chim. Acta, 84, 119-128 (1978)

156. KATTERMANN, R.

Zur Bestimmung des Kreatinins bei Ketonämie

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 5, 72-74 (1967)

157. KAYSER, F., A. MOLITOR

Dosage de la créatinine par le ferricyanure de potassium

Ann. Biol. Clin., 14, 219-222 (1956)

158. KAYSER, F., A. MOLITOR

Etude critique de l'application de la réaction de Jaffé au dosage de la créatinine dans le sang et dans l'urine

Ann. Pharm. Fr. 17, 197-208 (1956)

159. KELSEY, M.I., R. HOLDEN, E.A. MOSCATELLI

An improved method for the determination of creatinine in urine containing chlorpromazine metabolites

Biochem. Med., 11, 114-121 (1974)

160. KENYON, G.L., G.L. ROWLEY

Tautomeric preferences among glycocyamidines

J. Amer. Chem. Soc., 93, 5552-5560 (1971)

161. KIMURA, M.

Reaction between polynitrobenzene and active methylene groups. V. Jaffé and Baljet reactions

Pharm. Bull. Tokyo, 3, 81-83 (1955)

162. KING, H.

An new synthesis of creatine and alacreatine

J. Chem. Soc., 132, 2374-2377 (1930)

163. KNOLL,E., D. STAMM

Spezifische Kreatininbestimmung im Serum

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 8, 582-587 (197o)

164. KNOLL, E., H. WISSER

Kreatininbestimmung im Serum ohne Enteiweißung

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 11, 411-414 (1973)

165. KNOLL, E., F.C. REBEL, H. WISSER

Kinetische Kreatininbestimmung mit dem Gemsaec-Fast-Analyzer. Methodenvergleich mit der Fullererde-Methode

J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 16, 239-244 (1978)

166. KOENST, M.H., E.F. FREIER

An evaluation of two methods for the determination of true creatinine

Amer. J. Med. Technol., 37, 473-479 (1971)

167. KOHASHI, K., Y. OHKURA, T. MOMOSE

Mechanism of the color reaction of active methylene compounds with 1,3,5-trinitrobenzene-derivatives. II. Color reaction of acetone with 1,3,5-trinitrobenzene

Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 19, 2o65-2o71 (1971)

168. KOHASHI, K., Y. OHKURA, T. MOMOSE

Mechanism of the color reaction of active methylene compounds with 1,3,5-trinitrobenzene derivatives. III. The color reactions of cyclohexanone and acetophenone with 1,3,5-trinitrobenzene

Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 21, 118-124 (1973)

169. KOHASHI, K., Y.TSURUTA, Y. OHKURA

Mechanism of the color reaction of active methylene compounds with 1,3,5-trinitrobenzene derivatives. IX. Crystalline 1:2 complex of picric acid and creatinine

Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 25, 2127-213o (1977)

17o. KOHASHI, K., Y.TSURUTA, Y OHKURA

Mechanism of the color reaction of active methylene compounds with 1,3,5-trinitrobenzene derivatives. X. Three isomers of 1:2 complex of picric acid and creatinine

Chem. Pharm. Bull., (Tokyo), 26, 2914-2919 (1978)

171. KOHASHI, K., Y.TSURUTA, M. YAMAGUCHI, Y. OHKURA

Mechanism of the color reaction of active methylene compounds with 1,3,5-trinitrobenzene derivatives. XI. The Jaffé reaction

Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 27, 2122-2129 (1979)

172. KOISHI, H.

A critical examination on the Folin's method for determination of creatinine concentration in the urine

Osaka City Med. J., 8, 1-15 (1962)

173. KOSTIR, J.V., V. RABEK

The detection of Jaffé-positive substance in blood serum by paper partition chromatography. The problem of apparent creatinine

Biochim. Biophys. Acta, 5, 21o-223 (195o)

174. KOSTIR, J.V., J. SONKA

Creatinine estimation in blood serum

Biochim. Biophys. Acta, 8, 86-89 (1952)

175. KOVAR, K.-A.

Zur Spezifität der Vitali-Morin-Reaktion des DAB 7. 1. Mitteilung: Verbindungen mit aktivierter Methylen- bzw. Methingruppierung an Aromaten

Dtsch. Apoth.-Ztg., 11o, 15o9-1512 (197o)

176. KOVAR, K.-A.

Die Farbreaktion der Pikrinsäure mit Aceton und Kalilauge

Arch. Pharm., 3o5, 379-382 (1972)

177. KOVAR, K.-A.

Meisenheimer Strukturen der 2,4,6-Trinitro-3-hydroxy-benzoesäure

Arch. Pharm., 3o7, 1oo-1o5 (1974)

178. KOVAR, K.-A., G. FRANCAS, R.SEIDEL

Zum Mechanismus der Reaktionen nach Raymond, Kedde und Baljet

Arch. Pharm., 31o, 4o-47 (1977)

179. KOVAR, K.-A., M. SCHMID

Die Bestimmung von Kreatinin im Serum mit einem neuentwickelten enzymatischen Farbtest

Arch. Pharm., 312, 78o-791 (1979)

18o. KOWALSKY, A.,S. RATNER

A nuclear magnetic resonance study of the anhydrides of argininosuccinic acid and related guanidino compounds

Biochemistry, 8, 899-9o7 (1969)

181. KREBS, H.A., L.V. EGGLESTON

Bacterial urea formation (Metabolism of Corynebacterium ureafaciens)

Enzymologia, 7, 31o-32o (1939)

182. KROSS, R.D., V.A. FASSEL

Regularities in the infrared spectra of picric acid molecular complexes

J. Amer. Chem. Soc., 79, 38-41 (1957)

183. KÜFFER, H., R. TAKKINEN, R. JAAG

Die direkte Bestimmung des Creatinins in Plasma, Serum und Urin: Störung durch Bilirubin

Z. Klin. Chem. Biochem., 13, 244-245 (1975)

184. KURODA, N.

A portable micromethod for determining creatinine in blood serum

Tokushima J. Exp. Med., 9, 67-74 (1962)

185. LANG, E., J. SCHIRRMEISTER

Serumkreatininbestimmung mit Auto-Analyzer und Methode nach Popper, Mandel und Mayer

Ärztl. Lab., 15, 263-266 (1969)

186. LANGLEY, W.D., M. EVANS

The determination of creatinine with sodium 3,5-dinitrobenzoate

J. Biol. Chem., 115, 333-341 (1936)

187. LANSER, A., B.G. BLIJENBERG, B. LEIJNSE

Evaluation of a new diagnostic kit for the enzymatic determination of creatinine

J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 17, 633-638 (1979)

188. LARSEN, K.

Creatinine assay in the presence of protein with LKB 8600 Reaction Rate Analyser

Clin. Chim. Acta, 38, 475-476 (1972)

189. LARSEN, K.

Creatinine assay by a reaction-kinetic principle

Clin. Chim. Acta, 41, 209-217 (1972)

190. LAUSON, H.D.

Sources of error in plasma creatinine determination

J. Appl. Physiol. 4, 227-244 (1951)

191. LAWSON, A.M.

Prospects for mass spectrometry in clinical chemistry
Ann. Clin. Biochem., 12, 51-57 (1975)

192. LEMPERT, CH.

The chemistry of the glycocyamidines

Chem. Rev., 59, 667-736 (1959)

193. LIEBIG, J.

Über die Bestandtheile der Flüssigkeiten des Fleisches

Ann. Chem. Pharm., 62, 257-369 (1847)

194. LIM, C.K., W. RICHMOND, D.P. ROBINSON, S.S. BROWN

Towards a definitive assay of creatinine in serum and in urine: separation by high-performance liquid chromatography

J. Chromatogr., 145, 41-49 (1978)

195. LINNEWEH, F., W. LINNEWEH

Über Fehlerquellen der colorimetrischen Kreatin-Bestimmung nach dem Folinschen Prinzip

Klin. Wochenschr., 13, 589-591 (1934)

196. LJUNGGREN, G.

Darstellung von Acetessigsäurelösungen

Biochem. Z., 145, 422-425 (1924)

197. LØKEN, F.

On the determination of creatinine in plasma by the Jaffé reaction, after adsorption to Lloyd's reagent

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 6, 325-334 (1954)

198. LORENTZ, K., H. HOFFMEISTER

Untersuchungen über den Einfluß der Wasserstoffionen-konzentration auf die Spezifität der TTC-Reaktion

Mikrochim. Acta, 1062-1067 (1966)

199. LUSTGARTEN, J.A., R.E. WENK

Simple, rapid, kinetic method for serum creatinine measurement

Clin. Chem., 18, 1419-1422 (1972)

200. MADDOCKS, J., S. HANN, M. HOPKINS, G.A. COLES

Effect of methyldopa on creatinine estimation
Lancet, 157 (1973)

201. MANDEL, E.E., F. JONES

Studies in nonprotein nitrogen. III. Evaluation of methods measuring creatinine

J. Lab. Clin. Med., 41, 323-334 (1953)

202. MARTINEZ, E., P.D. DOOLAN

Determination of creatinine in small quantities of plasma

Clin. Chem., 6, 233-242 (1960)

2o3. MARTY, A., R. NORDMANN, J. NORDMANN

Recherches sur la biosynthèse de la créatinine a partir de la phosphocréatine

Bull. Soc. Chim. Biol., 43, 619-627 (1961)

2o4. MATSUMOTO, K., H. RAPOPORT

The preparation and properties of some acylguanidines

J. Org. Chem., 33, 552-558 (1968)

2o5. MAUNE, R.

Beitrag zur Kreatininbestimmung

Ernährungsforschung, 4, 9o-95 (1959)

2o6. MAW, G.A.

The detection of creatine and creatinine by partition chromatography.

Biochem. J., 43, 139-142 (1948)

2o7. MAZUR, R.H., B.W. ELLIS, P.S. CAMMARATA

A new reagent for detection of peptides, nucleotides, and other N-H-containing compounds on paper chromatograms

J. Biol. Chem., 237, 1619-1621 (1962)

2o8. McEVOY-BOWE, E.

Determination of creatinine in urine by separation on DEAE-Sephadex and ultraviolet spectrophotometry

Anal. Biochem., 16, 153-159 (1966)

2o9. McLEAN, M.H., J. GALLWAS

Evaluation of a creatininase creatinine procedure suitable for clinical use

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 29, Suppl. 126, 3o.1 (1972)

21o. McLEAN, M.H., J. GALLWAS, M. HENDRIXSON

Evaluation of an automated creatininase creatinine procedure

Clin. Chem., 19, 623-625 (1973)

211. MEISENHEIMER, J.

Über Reactionen aromatischer Nitrokörper

Ann. Chem., 323, 2o5-246 (19o2)

212. MEYERHOFF, M., G.A. RECHNITZ

An activated enzyme electrode for creatinine

Anal. Chim. Acta, 85, 277-285 (1976)

213. MIDDLETON, W.J., R.V. LINDSEY

Hydrogen bonding in fluoro alcohols

J. Amer. Chem. Soc., 86, 4948-4952 (1964)

214. MILLER, B.F., R. DUBOS

Studies on the presence of creatinine in human blood

J. Biol. Chem., 121, 447-456 (1937)

215. MILLER, B.F., R. DUBOS

Determination by a specific, enzymatic method of the creatinine content of blood and urine from normal and nephritic individuals

J. Biol. Chem., 121, 457-464 (1937)

216. MILLER, J.

Aromatic nucleophilic substitution

S. 366-388; London: Elsevier 1968

217. MITCHELL, R.J.

Improved method for specific determination of creatinine in serum and urine

Clin. Chem., 19, 4o8-41o (1973)

218. MOSS, G.A., R.J.L. BONDAR, D.M. BUZZELLI

Kinetic enzymatic method for determining serum creatinine

Clin. Chem. 21, 1422-1426 (1975)

219. MÜLLER, H., R. KLUTHE, A. ALEXANDROPOULOS

Eine Mikromethode zur Bestimmung des "wahren" Kreatinins

Z.Klin. Chem. Klin. Biochem., 8, 394-397 (197o)

22o. MUNZ, E.

Ergebnisse mit einer enzymatischen Methode zur Creatinin-Bestimmung

1st. European Congress of Clinical Chemistry, München (1974)

221. MUNZ, E., E. BERNT, A.-W. WAHLEFELD

Ergebnisse mit einer enzymatischen Methode zur Creatinin-Bestimmung

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 12, Abstract 17.4. (1974)

222. MURATA, T., S. ETO, K. YAMATSU, K. SUGIURA

Estimation of creatinine in urine with 3,5-dinitrobenzenesulfonate

Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 12, 77o-773 (1964)

223. MURFIN, P.A.

Estimation of creatinine in jaundiced urine

Clin. Chim. Acta, 21,158-159 (1968)

224. NAKADATE, M., T. MAKI, M. KIMURA

Fundamental studies on clinical chemistry. VIII. A new method for the colorimetric determination of urinary creatinine with 2,2', 4,4'-tetranitrobiphenyl

Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 12, 1276-1281 (1964)

225. NARAYANAN, S., H.D. APPLETON

Specifity of accepted procedures for urine creatinine

Clin. Chem., 18, 27o-274 (1972)

226. NEUBAUER, C.

Über Kreatinin

Ann. Chem. Pharm., 119, 27-52 (1861)

227. NEUBAUER, C.

Über quantitative Kreatin- und Kreatininbestimmung im Muskelfleisch

Z. Anal. Chem., 2, 22-34 (1863)

228. OLANSKY, A.S., S.N. DEMING

Automated development of a kinetic method for the continuous-flow determination of creatinine

Clin. Chem., 24, 2115-2124 (1978)

229. OSBERG, I.M., K.B. HAMMOND

An evaluation of the Gemeni centrifugal analyzer for the determination of serum creatinine

Clin. Chem., 23, 1168 (1977)

23o. OSBERG, I.M., K.B. HAMMOND

A solution to the problem of bilirubin interference with the kinetic Jaffé method for serum creatinine

Clin. Chem., 24, 1196-1197 (1978)

231. OWEN, J.A., B. IGGO, F.J. SCANDRETT, C.P. STEWART

The determination of creatinine in plasma or serum, and in urine;a critical examination

Biochem. J., 58, 426-437 (1954)

232. PAGET, M., M. GONTIER, J. LIEFOOGHE

Recherches sur le dosage de la créatinine urinaire

Ann. Biol. Clin., 13, 535-553 (1955)

233. PAREKH, C.K., J. KIRPAN, A. PETERSON, G.L. HASSERT, B.F. MURPHY

Automated simultaneous determination of p-amino-hippurate and creatinine in plasma or urine

Clin. Chem., 2o, 348-352 (1974)

234. PAREKH, A.C., S. COOK, C. SIMS, D.H. JUNG

A new method for the determination of serum creatinine based on reaction with 3,5-dinitrobenzoyl chloride in an organic medium

Clin. Chim. Acta, 73, 221-231 (1976)

235. PAREKH, A.C., C. SIMS

Serum creatinine assay by the use of 3,5-dinitroben-zoates: a critique

Clin. Chem., 23, 2o66-2o71 (1977)

236. PASTERNACK, A., B. KUHLBÄCK

Diurnal variations of serum and urine creatine and creatinine

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 27, 1-7 (1971)

237. PATAKI, G.

Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Kreatinin im Urin

Schweiz. Med. Wochenschr., 94, 1789-179o (1964)

238. PATAKI, G., M. KELLER

Quantitative Dünnschichtchromatographie. I. Mitteilung. Eine einfache Schnellmethode zur quantitativen Bestimmung von Kreatinin im Urin

Klin. Wochenschr., 43, 227-229 (1965)

239. PAUMGARTNER, G., O. KRAUPP, F.X. FISCHER

Papierchromatographische Auftrennung und Bestimmung von Kreatin und Kreatinin im Plasma

Clin. Chim. Acta, 8, 96o-965 (1963)

24o. PETERS, J.H.

The determination of creatinine and creatine in blood and urine with the photoelectric colorimeter

J. Biol. Chem., 146, 179-186 (1942)

241. PETTENKOFER, M.

Vorläufige Notiz über einen neuen stickstoffhaltigen Körper im Harne

Ann. Chem. Pharm., 52, 97-1oo (1844)

242. PFEIL, D.

Beitrag zur Bestimmung des Gesamtkreatinins in Lebensmitteln

Z. Anal. Chem., 154, 5-7 (1957)

243. PLACE, J.F.

Comparison of high-pressure liquid chromatographic and ion-exchange membrane methods for creatinine

J. Pharm. Sci., 68, 8o2 (1979)

244. PLENNER, W., W. HEINE

Normalwerte. Untersuchungsergebnisse beim gesunden Menschen unter besonderer Berücksichtigung des Kindesalters. 4. Aufl., Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit 1973

245. POLAR, E., J. METCOFF

"True" creatinine chromogen determination in serum and urine by semi-automated analysis

Clin. Chem., 11, 763-77o (1965)

246. POPPER, H., E. MANDEL, H. MAYER

Zur Kreatininbestimmung im Blute

Biochem. Z., 291, 354-367 (1937)

247. PU, F.S., W.L. CHIOU

Creatinine VII; determination of salvia creatinine by high-performance liquid chromatography

J. Pharm. Sci., 68, 534-535 (1979)

248. RAABO, E., P. WALLÖE-HANSEN

A routine method for determining creatinine avoiding deproteinization

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 29, 297-3o1 (1972)

249. RALSTON, M.

Plasma creatinine

J. Clin. Path., 8, 16o-162 (1955)

25o. RAUCH, S.

Biochemie des Hörorgans.

S. 219-224, 242-245, 283-284; Stuttgart: Thieme 1964

251. RAUENBUSCH, E., G. GERBER, G.B. GERBER, K. ALTMAN

A method for the degradation of creatinine and creatine applicable to isotope studies

Clin. Chim. Acta, 5, 499-5o1 (196o)

252. REIO, L.

Supplementary data for the paper-chromatographic separation and identification of phenol derivatives and related compounds of biochemical interest, using a "reference system"

J. Chromatogr., 4, 458-476 (196o)

253. RIEGERT, A.

Un nouveau microdosage colorimétrique de la créatinine, son application au plasma et au sérum

C.R. Séances Soc. Biol., 132, 535-537 (1939)

254. RINK, M., D. KREBBER

Dünnschichtchromatographische Bestimmung von Kreatinin und Kreatin im Harn

J. Chromatogr., 25, 8o-86 (1966)

255. ROCKERBIE, R.A., K.L. RASMUSSEN

Rapid determination of serum creatinine by an ion-exchange technique

Clin. Chim. Acta., 15, 475-479 (1967)

256. RÖTTGER, H.

Über die Bestimmung des Kreatinins und Kreatins im Harn und Serum mit der Dinitrobenzoatmethode

Biochem. Z., 319, 359-369 (1949)

257. ROSCOE, M.H.

The estimation of creatinine in serum

J. Clin. Path., 6, 2o1-2o7 (1953)

258. ROSCOE, M.H.

Plasma chromogen and the endogenous creatinine clearance

J. Clin. Path., 11, 173-176 (1958)

259. ROSE, W., B. UHLEMANN

Zur Methodik der Kreatininbestimmung

Dtsch. Gesundheitswes., 21, 2137-214o (1966)

26o. SADILEK, L.

Creatinine determination in the urine of alcaptonuric patients

Clin. Chim. Acta, 12, 436-439 (1965)

261. SASAKI, T.

Über eine Farbenreaktion von Glycinanhydrid und der Dipeptidanhydride, welche eine Glycylkomponente in sich schließen

Biochem. Z., 114, 63-66 (1921)

262. SCHEUERBRANDT, G., R. HELGER

Methode zur Kreatininbestimmung

Ärztl. Lab., 15, 65-68 (1969)

263. SCHINDLER, K.

Perilymphe als Ultrafiltrat des Serums

Arch. Ohr.-Nas.-u. Kehlk.-Heilk., 185, 586-592 (1965)

264. SCHNIEDER, E.-A.

Die Entstehung des Schalltraumas. Ein Beitrag über die Physiologie der Perilymphe.

Habil.-Schrift, Würzburg 197o

265. SCOTT,CH. D., J.E. ATTRILL, N.G. ANDERSON

Automatic, high-resolution analyses of urine for its ultraviolet-absorbing constituents

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 125, 181-184 (1967)

266. SEELIG, H.P.

Die Jaffé-Reaktion mit Kreatinin. Reaktionsprodukt und allgemeine Reaktionsbedingungen

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 7, 581-585 (1969)

267. SEELIG, H.P., H. WÜST

Die Kreatininbestimmung mit der Jaffé-Reaktion

Ärztl. Lab., 15, 34-39 (1969)

268. SERVER FALGAS, G.

Crítica de la racción de Jaffé y aplicación del reactivo de Lloyd para la determinación de creatinina en líquidos biológicos

Rev. Clin. Esp., 85, 173-177 (1962)

269. SERVIS, K.L.

Nuclear magnetic resonance studies of Meisenheimer complexes

J. Amer. Chem. Soc., 87, 5495-5497 (1965)

27o. SHOUCRI, R.M., M. POULIOT

Some observations on the kinetics of the Jaffé reaction for creatinine

Clin. Chem., 23, 1527-153o (1977)

271. SIERSBAEK-NIELSEN, K., J. MOELHOLM HANSEN, J. KAMPMANN, M.KRISTENSEN

Rapid evaluation of creatinine clearance

Lancet I, 1133-1134 (1971)

272. SIMS, Ch., A.C. PAREKH

Determination of serum creatinine by reaction with methyl-3,5-dinitrobenzoate in methyl sulfoxide

Ann. Clin. Biochem., 14, 227-232 (1977)

273. SINHA, S.N., E.R. GABRIELI

A new specific assay for urinary creatinine

Clin. Chem., 15,879-883 (1969)

274. SKRAMONSKY, S.

Potentiometric oxidimetric determinations with mercurous and mercuric salts

Chem. Abstr., 5o, 315o b (1956)

275. SLOT, C.

Plasma creatinine determination
A new and specific Jaffé reaction method

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 17, 381-387 (1965)

276. SOLDIN, S.J., L. HENDERSON, J.G. HILL

The effect of bilirubin on reaction rate methods for the measurement of creatinine

Clin. Chem., 23, 1141 (1977)

277. SOLDIN, S.J., L. HENDERSON, J.G. HILL

The effect of bilirubin and ketones on reaction rate methods for the measurement of creatinine

Clin. Biochem., 11, 82-86 (1978)

278. SOLDIN, S.J., J.G. HILL

Micromethod for determination of creatinine in biological fluids by high-performance liquid chromatography

Clin. Chem., 24, 747-75o (1978)

279. SOLDIN, S.J., J.G. HILL

A rapid specific micromethod for the determination of creatinine in biological fluids by high-performance liquid chromatography

Clin. Chem., 24, 1o51 (1978)

28o. SPANNER, S., R.J. BOSCOTT

A simplified technique for removal of compounds interfering in creatinine determinations

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 8, 25o (1956)

281. SPIERTO, F.W., M.L. McNEIL, C.A. BURTIS

The effect of temperature and wavelength on the measurement of creatinine with the Jaffé procedure

Clin. Biochem., 12, 18-21 (1979)

282. STAAB, H.A.

Einführung in die theoretische organische Chemie.

4. Aufl. Weinheim/Bergstr.: Verl. Chemie 1964

283. STELGENS, P., H. WOLF, K. SCHREIER

Eine colorimetrische Mikromethode zur Bestimmung des Kreatinins und Kreatins im Blut und Harn

Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 286, 218-229 (1950)

284. STELGENS, P.

Über die Kreatinkörperbestimmung mit Kaliumquecksilberrhodanid und Dithizon. I

Biochem. Z., 323, 480-487 (1953)

285. STELGENS, P.

Über die Kreatinkörperbestimmung mit Kaliumquecksilberrhodanid und Dithizon. II

Biochem. Z., 324, 228-236 (1953)

286. STOTEN, A.

A micromethod for creatinine using resin to remove interfering substances

J. Med. Lab. Technol., 25, 240-247 (1968)

287. STRAUSS, M.J.

Anionic sigma complexes

Chem. Rev., 70, 667-712 (1970)

288. STRAUSS, M.J., H. SCHRAN

The kinetics of intramolecular Meisenheimer complex cyclizations to bicyclic dinitropropenide anions. A mechanism for the reaction

Tetrahedron Lett., 25, 2349-2352 (1971)

289. SULLIVAN, M.X., F. IRREVERRE

A new and highly specific test for creatinine

J. Biol. Chem., 128, ci (1939)

290. SULLIVAN, M.X., F. IRREVERRE

A highly specific test for creatinine

J. Biol. Chem., 233, 530-534 (1958)

291. SWAIN, R.R., S.L. BRIGGS

Positive interference with the Jaffé reaction by cephalosporin antibiotics

Clin. Chem., 23, 1340-1342 (1977)

292. SZASZ, G., U. BÖRNER, F. STÄHLER, W.G. BABLOK

Reference values for creatinine in serum established by a highly specific enzymatic method

Clin. Chem., 23, 1172 (1977)

293. SZASZ, G., U. BÖRNER

Six alkaline picrate methods for serum creatinine compared with a highly specific enzymatic assay

Clin. Chem., 24, 997 (1978)

294. TAUSSKY, H.H.

A microcolorimetric determination of creatine in urine by the Jaffé reaction

J. Biol. Chem., 2o8, 853-861 (1954)

295. TAUSSKY, H.H.

A procedure increasing the specifity of the Jaffé reaction for the determination of creatine and creatinine in urine and plasma

Clin. Chim. Acta, 1, 21o-224 (1956)

296. TEGER-NILSSON, A.-C.

Serum creatinine determination using an ion-exchange resin

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 13, 326-331 (1961)

297. TERESI, J.D.

The combination of organic anions with serum albumin. VII. The protein sites involved in the combination

J. Amer. Chem. Soc., 72, 3972-3978 (195o)

298. THOMPSON, H., G.A. RECHNITZ

Ion electrode based enzymatic analysis of creatinine

Anal. Chem., 46, 246-249 (1974)

299. THORN, W., W. ISSELHARD, K. IRMSCHER

Verwendung der Hochspannungselektrophorese für quantitative Metabolitbestimmungen

Biochem. Z., 33o, 385-399 (1958)

3oo. TYIHAK, E., D.VAGUJFALVI

Dragendorff reactions for visualization of amino acids and amino acid derivatives separated by paper or thin-layer chromatography

J. Chromatogr., 49, 343-348 (197o)

3o1. UEDA, H.

Electron spin resonance studies of irradiated single crystals of creatinine and creatine

J. Chem. Phys., 4o, 9o1-9o5 (1964)

3o2. UEDA, H., N. SAKABE, J. TANAKA, A. FURUSAKI

The structure of Meisenheimer complex as determined by X-ray crystal analysis

Bull. Chem. Soc. Japan, 41, 2866-287o (1968)

303. VAN PILSUM, J.F., R.P. MARTIN, E. KITO, J. HESS

Determination of creatine, creatinine, arginine, guanidinoacetic acid, guanidine, and methylguanidine in biological fluids

J. Biol. Chem., 222, 225-236 (1956)

304. VAN PILSUM, J.F., M. BOVIS

Effect of various protein precipitants on recoveries of creatinine, added to plasma

Clin. Chem., 3, 90-94 (1957)

305. VAN PILSUM, J.F., B. HILLER

On the proposed origin of creatinine from creatine phosphate

Arch. Biochem. Biophys., 85, 483-486 (1959)

306. VAN PILSUM, J.F., G.C. STEPHENS, D. TAYLOR

Distribution of creatine, guanidinoacetate and the enzymes for their biosynthesis in the animal kingdom

Biochem. J., 126, 325-345 (1972)

307. VARMA, S.D., I.S. YADAVA, D. CHAND

Microdetermination of creatinine

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 6, 111-112 (1968)

308. VASILIADES, J.

Reaction of alkaline sodium picrate with creatinine: I. Kinetics and mechanism of formation of the mono-creatinine picric acid complex

Clin. Chem., 22, 1664-1671 (1976)

309. WAHLEFELD, A.W., G. HERZ, H.U. BERGMEYER

A completely enzymatic determination of creatinine in human sera or urine

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 29, Suppl. 126, Abstract 30.1 (1972)

310. WALKER, J.B., M.S. WALKER

Formation of creatine from guanidinoacetate in pancreas

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 101, 807-809 (1959)

311. WARD, P., M.EWEN, J.A. POMEROY, F.Y. LEUNG

Kinetic urine creatinine determination with the Gemsaec analyzer

Clin. Biochem., 9, 225-227 (1976)

312. WATKINS, P.J.

The effect of ketone bodies on the determination of creatinine

Clin. Chim. Acta, 18, 191-196 (1967)

313. WATKINS, R.E., C.S. FELDKAMP, R.J. THIBERT, B.ZAK

Interesting interferences in a direct serum creatinine reaction

Microchem. J., 21, 37o-384 (1976)

314. WEISE, W., C. TROPP

Untersuchungen über die Jaffésche Pikrinsäure-reaktion

Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 178, 125-138 (1928)

315. WILLIAMS, D.H., I. FLEMING

Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung.

3. Aufl. S. 12-4o; Stuttgart: Thieme 1975

316. WOLLENBERGER, A.

Ultraviolet absorption spectra of creatinine

Acta Chem. Scand., 7, 445-446 (1953)

317. YATZIDIS, H.

New method for direct determination of "true" creatinine

Clin. Chem., 2o, 1131-1134 (1974)

318. YATZIDIS, H.

Improved determination of "true" creatinine in serum or plasma

Clin. Chem., 21, 1848 (1975)

319. ZENDER, R., A. FALBRIARD

Analyse automatique de la créatinine dans le sérum et dans l'urine. Valeurs "normales" chez l'homme de la créatininémie et de la clearance

Clin. Chim. Acta, 12, 183-19o (1965)

32o. ZENDER, R., P. JACOT

A kinetic method for analysis of creatinine using the DSA-56o

Anal. Lett., 5, 143-152 (1972)

LEBENSLAUF

Am 15. August 1942 wurde ich, Dietrich Nitsche, als Sohn des Majors Hellmuth Nitsche und seiner Ehefrau Hildegard geb. Reinhold in Erfurt geboren. Im Jahre 1947 übersiedelte ich mit meinen Eltern nach Marktbreit/Krs. Kitzingen, wo ich von 1949 - 1953 die Volksschule und anschließend bis 1959 das Gymnasium besuchte. Ab 1959 besuchte ich das Röntgen-Gymnasium in Würzburg, welches ich im Juli 1962 mit dem Zeugnis der Reife verließ.

Im Wintersemester 1962/63 begann ich das Studium der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Am 4. Mai 1965 bestand ich die ärztliche Vorprüfung. Nach den ersten 3 klinischen Semestern in Würzburg wechselte ich im Wintersemester 1966/67 an die Universität Kiel über, wo ich das Staatsexamen am 14.3.1969 bestand. Nach der Medizinalassistentenzeit in Würzburg und Kiel erhielt ich die Approbation als Arzt am 28.10.1970. Seit dem 1.11.1970 bin ich an der Abtl. für Allgemeine Chirurgie der Chirurgischen Universitätsklinik Kiel tätig, wo ich die Facharztausbildung für Chirurgie erhielt.

Dietrich Nitsche